

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología



**EFFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y LA RESTRICCIÓN
CALÓRICA EN LA RESPUESTA A LA ENDOTELINA-1 Y LA
INSULINA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR**

TESIS DOCTORAL
Sara Amor Santiago
2017



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Dr. Ángel Luis García Villalón Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Miriam Granado García, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Dña SARA AMOR SANTIAGO ha realizado bajo su dirección el trabajo: “EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN LA RESPUESTA A LA ENDOTELINA-1 Y LA INSULINA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR” con el objetivo de obtener el Grado de Doctor.

DIRECTORES

Dr. Ángel Luis García Villalón

Dra. Miriam Granado García

Este trabajo de investigación ha sido financiado por los Proyectos UAM-Banco de Santander con
EEUU (Convocatoria 2013) y con Asia (Convocatoria 2015).

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de toda esta etapa, he aprendido mucho más que ciencia, y puedo estar orgullosa de la gente que me ha rodeado. Este trabajo es el resultado del esfuerzo de varias personas que no solo intervinieron directamente en la realización de los experimentos y análisis de los resultados, sino también participaron de forma decisiva en mi formación profesional y orientación hacia la investigación. Por ello, con este apartado me gustaría expresar mi gratitud a todas las personas que de alguna forma han aportado algo a este trabajo.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Miriam Granado García, co-directora de esta Tesis, la oportunidad que me dio al embarcarme en esta magnífica aventura, por confiar en mí desde el primer momento, porque desde el minuto uno ha estado apoyándome y dándome ánimos para que no tirara la toalla y siguiera adelante en la trayectoria investigadora, pero sobre todo por el tiempo que me ha dedicado. Me has enseñado, aguantado, aconsejado, reído y llorado conmigo, pero también has sido una gran confidente y amiga. Hoy en día, prácticamente, todo lo que sé en el laboratorio es gracias a ti, donde me has aportado una buena base en fisiología. Eres el vivo reflejo de que con trabajo se consiguen las metas, y te doy las gracias por contagiarnos con tu entusiasmo cuando las cosas en el laboratorio funcionan, es admirable la pasión con la que afrontas tu trabajo día a día. Te admiro, profesional y personalmente. Simplemente gracias.

Al Dr. Ángel Luis García Villalón, co-director de esta Tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio y adentrarme en el mundillo tan asombroso del *Langendorff*. También por los buenos consejos y sobre todo, porque me apasiona su forma de explicar la Fisiología, como si se tratara de un cuento del que siempre querrías saber lo que pasa en la siguiente página.

Gracias a Bea, mi compañera en el laboratorio, por todo lo que me ha ayudado en este trabajo y sobre todo por todos los grandes momentos vividos. Porque tu perseverancia hace de ti una persona que estoy segura que llegará muy lejos y que conseguirá todo lo que se proponga, aunque a veces lo vea todo nublado y no sea capaz de divisar el frente. Has sido la mejor compañera de batalla que podía tener. No sé dónde acabaremos con el paso de los años, pero estoy segura que allá donde

estemos mantendremos el contacto. Agradecer a Dani y Antonio, mis bioquímicos, gracias por sacarme una sonrisa, sois unos soletes.

A mi compañera de despacho Pilar por los ánimos que cada día me ha dado, las risas y por volcarse conmigo cada vez que me surgía alguna duda o estaba al borde de abismo. También dar las gracias a David y Cinthia por el apoyo que me han ofrecido.

A todos los profesores del departamento de Fisiología, los cuales cuando tenían que hacer alguna fotocopia en el C-26 se acercaban a la puerta y me preguntaban cómo iba con la Tesis.

A mis mejores amigas, Laura y Vero, habéis sido una gran vía de escape, poniendo mucho más de lo que pensáis en esta Tesis. Gracias por darme cada día vuestra inyección de cariño y de humor a partes iguales que tanto me ha ayudado, y por comprenderme tan bien en todo momento. Sois las mejores y os quiero con locura.

Las gracias más grandes a mis padres. Vosotros me habéis enseñado las cosas más importantes que sé y os lo debo todo. Gracias a vuestro ejemplo sé que ningún esfuerzo es en vano, y que con dedicación y humildad se puede llegar tan lejos como se quiera. Sé la ilusión especial que os hace esta Tesis y lo mucho que significa para vosotros, vuestro orgullo por mí me hace inmensamente feliz. Os quiero.

Quisiera también agradecer muy especialmente a mi hermana Laura, por todo el apoyo que me ha dado en este largo camino, y por la felicidad que me ha transmitido una y otra vez cuando se alegraba por cada una de las pruebas superadas en mi carrera profesional. Además, darte de gracias por haberme dado a la sobrina más bonita del mundo, Lola, que con esos ojazos grises y esa boquita de piñón me tiene tan enamorada. Tati, eres un pilar fundamental para mí, te quiero.

Y por supuesto, a Manu, mi compañero de vida. Gracias por tu cariño, confianza y apoyo en los buenos y malos momentos, por la paciencia, por aguantar muchas veces mi mal humor y tristeza al llegar a casa y por animarme y hacerme ver las cosas siempre de una forma más positiva, pero sobre todo por creer en mí. Gracias cariño.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	20
INTRODUCCIÓN	23
1. Efectos del envejecimiento en el sistema cardiovascular	24
1.1. Efectos del envejecimiento sobre el corazón	24
1.2. Efectos del envejecimiento sobre la vasculatura	26
1.3. Inflamación y estrés oxidativo	28
2. Endotelina-1	29
2.1. Estructura y síntesis	29
2.2. Receptores y mecanismo de acción	30
2.3. Otros efectos de la ET-1	33
2.4. Efectos de la ET-1 en el envejecimiento	33
3. Insulina	34
3.1. Estructura y síntesis	34
3.2. Mecanismo de acción	38
3.3. Acciones de la insulina	41
3.3.1. Metabólicas	41
3.3.2. Cardiovasculares	42
3.3.2.1. Acciones de la insulina en los vasos	42
3.3.2.1.1. <u>Producción de NO y ET-1 en el endotelio</u>	42
3.3.2.1.2. <u>Efectos de la insulina en las CMLV</u>	44
3.3.2.2. Acciones de la insulina en el corazón	45
3.4. Resistencia cardiovascular a la insulina	47
3.4.1. Mecanismos implicados en la resistencia cardiovascular a la insulina	50
3.4.1.1. Glucotoxicidad	50

3.4.1.2.	Lipotoxicidad	51
3.4.1.3.	Inflamación	52
3.5.	Efectos del envejecimiento sobre la sensibilidad a la insulina	53
4.	Restricción calórica y envejecimiento	55
4.1.	Restricción calórica y resistencia a la insulina	56
4.2.	Efectos de la restricción calórica en el sistema cardiovascular	57
4.3.	Modelos experimentales de restricción calórica	59
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		61
MATERIAL Y MÉTODOS		63
1.	Animales	64
2.	Obtención y procesamiento de muestras	64
3.	Determinación de los niveles circulantes de glucosa, insulina, NEFAs, triglicéridos y colesterol total	65
4.	Técnica del corazón perfundido (<i>Langendorff</i>)	65
5.	Experimentos de reactividad vascular en arterias renales y aorta	67
5.1.	Reactividad vascular en respuesta a la ET-1	68
5.2.	Reactividad vascular en respuesta a la insulina	68
6.	Incubación de segmentos arteriales en presencia o ausencia de insulina y determinación de nitritos y nitratos en el medio de cultivo	69
7.	Cultivo primario de células endoteliales de aorta	70
7.1.	Crecimiento y proliferación del cultivo	70
7.2.	Siembra del experimento	71
8.	Cuantificación de proteínas en tejido arterial y cardíaco	72
8.1.	Extracción de proteínas	72
8.2.	Western Blot	72
9.	Cuantificación de la expresión génica por RT-PCR a tiempo real	74

9.1. Extracción de ARN	74
9.2. Reacción de Retrotranscripción (RT)	74
9.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-PCR)	75
10. Análisis estadístico	76
RESULTADOS	77
1. Parámetros generales	78
1.1. Composición corporal	78
1.2. Perfil metabólico	78
1.3. Parámetros funcionales basales en los corazones perfundidos	79
2. Efectos de la edad y la RC sobre la respuesta cardiovascular a la ET-1	80
2.1. Corazón	80
2.1.1. Vasoconstricción coronaria en respuesta a la ET-1	80
2.1.2. Presión intraventricular, contractilidad del miocardio y frecuencia cardíaca en respuesta a la ET-1	81
2.1.3. Expresión génica de ET-1, ET _A y ET _B	83
2.1.4. Expresión génica de TGF- β 1, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β	84
2.1.5. Expresión génica de eNOS, iNOS y nNOS	84
2.2. Arterias renales	85
2.2.1. Respuesta vascular a la ET-1	85
2.2.2. Implicación de los receptores ET _A y ET _B en la respuesta contráctil a la ET-1	86
2.2.3. Implicación del NO en la respuesta contráctil a la ET-1	87
2.2.4. Niveles proteicos de ET-1, ET _A y ET _B	88
2.2.5. Expresión génica eNOS, iNOS y nNOS	89
2.2.6. Expresión génica de TGF- β 1, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β	90
3. Efectos de la edad y la RC sobre la respuesta cardiovascular a la insulina	91
3.1. Corazón	91

3.1.1.	Vasodilatación coronaria en respuesta a la insulina en presencia o ausencia de Wortmanina	91
3.1.2.	Presión intraventricular, contractilidad del miocardio y frecuencia cardíaca en respuesta a la insulina en presencia o ausencia de Wortmanina	92
3.1.3.	Activación de las vías de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK en respuesta a la insulina	94
3.1.4.	Expresión génica de GLUT-4, IR, ET-1 y eNOS en respuesta a la insulina	95
3.2.	Aorta	97
3.2.1.	Resultados en segmentos de aorta no rodeados por PVAT	97
3.2.1.1.	Relajación en respuesta a la insulina en presencia o no de L-NAME	97
3.2.1.2.	Liberación de NO ₂ + NO ₃ en respuesta a la insulina	98
3.2.1.3.	Vasoconstricción en respuesta a la insulina	99
3.2.1.4.	Vasoconstricción en respuesta a la insulina en presencia de Losartán, BQ-123 o Furegrelato	100
3.2.1.5.	Activación de las vías de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK en respuesta a la insulina	101
3.2.1.6.	Expresión génica de eNOS, IR y GLUT-4 en respuesta a la insulina	103
3.2.2.	Resultados en segmentos de aorta rodeados de PVAT	104
3.2.2.1.	Expresión génica de eNOS, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el PVAT	104
3.2.2.2.	Efecto del PVAT en la relajación en respuesta a la insulina	104
3.2.2.3.	Liberación de NO ₂ + NO ₃ en respuesta a la insulina y al PVAT	107
3.3.	Células endoteliales	107
3.3.1.	Liberación de NO ₂ + NO ₃ en respuesta a la insulina	107
3.3.2.	Activación de las vías de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK en respuesta a la insulina	108
3.3.3.	Expresión génica de eNOS e IR en respuesta a la insulina	109

DISCUSIÓN	111
1. Efectos de la edad y la RC en la composición corporal y el perfil metabólico	112
2. Efectos de la edad y la RC sobre la función cardíaca	114
3. Efectos de la edad y la RC sobre la función cardíaca en respuesta a la ET-1	115
4. Efectos de la edad y la RC sobre la expresión de marcadores proinflamatorios y profibróticos en el miocardio	119
5. Efectos de la edad y la RC en la respuesta de las arterias renales a la ET-1	120
6. Efectos del envejecimiento y la RC sobre la función cardíaca en respuesta a la Insulina	124
7. Efectos del envejecimiento y la RC sobre la función vascular en respuesta a la Insulina	129
8. Efectos del envejecimiento y la RC en el tejido adiposo perivascular (PVAT)	133
8.1. Efectos del envejecimiento y la RC en segmentos de aorta rodeados por PVAT en respuesta a la insulina	135
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	142
ANEXOS. Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral	170

ABREVIATURAS

3m	Ratas de 3 meses de edad alimentadas <i>ad libitum</i>
24m	Ratas de 24 meses de edad alimentadas <i>ad libitum</i>
24m-RC	Ratas de 24 meses de edad sometida a una restricción calórica
[Ca²⁺]_i	Concentración de ion Calcio intracelular
ACh	Acetilcolina
Acil-CoA	Acil Coenzima A
ADN	Ácido dexosirribolucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico monocatenario
ADP	Adenosín difosfato
ADRF	Factor relajante derivado de adipocitos
AGE	Compuesto de glucosilación avanzada
Akt	Protein quinasa B
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT₁	Receptor de angiotensina tipo 1
ATP	Adenosín trifosfato
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BQ-123	Antagonista del receptor de endotelina-1 tipo A
BQ-788	Antagonista del receptor de endotelina-1 tipo B
BSA	Albúmina bovina sérica
Ca²⁺	Ion Calcio
CaM	Calmodulina
CE₅₀	Concentración de sustrato que produce el 50% del efecto máximo

CMLV	Células musculares lisas vasculares
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAG	Diacilglicerol
dP/dt	Contractilidad miocárdica
ECE-1	Enzima de conversión de la endotelina tipo 1
ECE-2	Enzima de conversión de la endotelina tipo 2
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERA	<i>Endothelin receptor antagonists</i>
ET-1	Endotelina-1
ET_A	Receptor de la endotelina-1 tipo A
ET_B	Receptor de la endotelina-1 tipo B
GLUT-1	Transportador de glucosa tipo 1
GLUT-2	Transportador de glucosa tipo 2
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
Grb2	Proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2
H⁺	Ion Hidrógeno o protón
H₂O	Molécula de agua
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HSP90	Proteína <i>heat shock</i> 90
ICAM	Molécula de adhesión intercelular

IKKβ	Quinasa inhibidora kB
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-12 β	Interleuquina 12 β
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃	inositol 1,4,5-trifosfato
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato del receptor de insulina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
K⁺	Ion Potasio
KCl	Cloruro de potasio
L-NAME	Inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Protein quinasa activada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimio-atrayente monocítica-1
MEC	Matriz extracelular
MEK	Quinasa de MAPK/ERK
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
Na⁺	Ion Sodio
NADPH	Adenina dinucleótido fosfato
NaCl	Cloruro sódico
NaNO₂	Nitrito de sodio
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS	Óxido nítrico sintasa
NO	Óxido nítrico
O₂	Oxígeno
O₂⁻	Anión superóxido
OLETF	Ratas de la cepa <i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty</i>
p85	Subunidad reguladora de PI3K
p110	Subunidad catalítica de PI3K
p-Akt	Protein quinasa B fosforilada
p-eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial fosforilado
p-MAPK	Protein quinasas activadoras de mitógenos fosforilada
PAI-1	Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinositidos-1
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PKA	Protein quinasa A
PKC	Protein quinasa C
PKCβ1	Protein quinasa C tipo β1
PKCβ2	Protein quinasa C tipo β2
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PRC	Proteína C reactiva
PVAT	Tejido adiposo perivascular
PVDF	Difluoruro de polivinidileno
RAS	Proteína monomérica de unión a GTP
RAF-1	Protein quinasa específica de serina/treonina (Fibrosarcoma Rápidamente Acelerado)
RC	Restricción calórica
RhoK	Rho quinasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S.E.M	Error estándar de la media
SD	Ratas de la cepa <i>Sprague-Dawley</i>
Ser	Serina
SFB	Suero bovino fetal
SH2	Homología Src 2
Shc	Proteína que contiene un dominio con homología Src 2
SIRT-1	Sirtuina-1
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral tipo α
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
Thr	Treonina
TTBS	Tween 20 Tris-Buffer Saline
TXA₂	Tromboxano A ₂

Tyr	Tirosina
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

INTRODUCCION: El envejecimiento cursa con alteraciones estructurales y funcionales en el sistema cardiovascular. La restricción calórica (RC) es uno de los hábitos más utilizados para retrasar el envejecimiento.

OBJETIVO: El objetivo de estudio fue analizar los efectos del envejecimiento y la RC sobre la respuesta del corazón y los vasos a la endotelina-1 (ET-1) y a la insulina

MATERIAL Y MÉTODOS: Para ello se utilizaron ratas *Wistar* de 3 y 24 meses de edad (3m y 24m), estas últimas sometidas o no a una RC del 20% durante sus 3 últimos meses de vida (24m-RC). Se perfundieron los corazones mediante la técnica de *Langendorff* y se estudiaron los efectos de la ET-1 y la insulina sobre la circulación coronaria y la contractilidad ventricular. Por otro lado, se valoró la respuesta de anillos de arterias renales a la ET-1 y de anillos de aorta a la insulina y se analizó la expresión de marcadores relacionados con las vías de activación de ambos péptidos en tejido arterial y cardíaco por Western Blot. Asimismo, se valoró la expresión génica de diferentes marcadores proinflamatorios y profibróticos en ambos tipos de tejido así como en el tejido adiposo perivascular (PVAT) por RT-PCR. Por último, se realizaron cultivos primarios de células endoteliales para determinar los efectos específicos de la insulina sobre el endotelio.

RESULTADOS: La RC disminuyó el peso corporal y el peso del tejido adiposo visceral y subcutáneo y aumentó el peso del músculo gastrocnemio y del corazón en los animales de 24m. A nivel cardíaco el envejecimiento disminuyó el efecto vasoconstrictor coronario y aumentó el efecto inotrópico positivo en respuesta a la ET-1 siendo estos cambios atenuados por la RC. Igualmente la RC atenuó el aumento en la expresión de la iNOS y el TNF- α y la disminución en los niveles de ARNm de la eNOS y los receptores ET_B inducidos por el envejecimiento en el tejido cardíaco. Sin embargo, la RC no previno el aumento en la vasoconstricción de las arterias renales en respuesta a la ET-1 asociado al envejecimiento a pesar de que aumentó la expresión de la eNOS y disminuyó la expresión de la iNOS en el tejido arterial. El envejecimiento cursó con resistencia cardíaca a la insulina ya que la vasodilatación de las arterias coronarias y el aumento en la contractilidad en

respuesta a esta hormona fue menor en las ratas de 24m, cambios que se atribuyeron a una disminución en la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. Estos efectos fueron parcialmente revertidos por la RC, la cual aumentó la activación de esta vía y la expresión de los transportadores GLUT-4 en el tejido cardíaco. Igualmente la RC previno la resistencia vascular a la insulina inducida por el envejecimiento en segmentos de aorta mediante un aumento en la biodisponibilidad del NO. Estos cambios en la función vascular se acompañaron de una mayor activación de la vía PI3K/Akt en el tejido arterial y en cultivos primarios de células endoteliales. Asimismo la RC disminuyó la expresión de la iNOS y aumentó la de la eNOS en la aorta y disminuyó la expresión de marcadores proinflamatorios en el PVAT.

CONCLUSIÓN: En conclusión, el envejecimiento cursa con alteraciones en la respuesta cardiovascular a la ET-1 y a la insulina que son revertidas, al menos en parte, por un protocolo de RC moderado. Estos resultados sugieren que este protocolo de RC podría ser una estrategia útil para prevenir el deterioro cardíaco y la disfunción endotelial inducidos por el envejecimiento.

PALABRAS CLAVE: Envejecimiento, sistema cardiovascular, restricción calórica, endotelina-1, resistencia a insulina.

INTRODUCCIÓN

1. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) suponen la primera causa de muerte en el mundo tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, representando el 30% del total de muertes. Entre los múltiples factores implicados se encuentran el perfil genético, la obesidad, el tabaquismo, la inactividad física y el envejecimiento, habiéndose establecido que, de todos ellos, el que representa un mayor riesgo es la edad avanzada (Lakatta and Levy 2003).

El proceso de envejecimiento está programado genéticamente y modificado por influencias ambientales, de modo que la tasa de envejecimiento puede variar ampliamente entre individuos. Dado que la esperanza de vida ha aumentado considerablemente en todo el mundo en el último siglo, la incidencia de ECV inducidas por la edad también ha aumentado, siendo una de las principales causas de mortalidad entre la población de más de 65 años (Lakatta and Levy 2003). La prevalencia de ECV es superior al 70% en individuos de 60 a 79 años de edad y superior al 80% para individuos de más de 80 años de edad (Go, Mozaffarian et al. 2014). Además, el envejecimiento cardiovascular se asocia con un deterioro progresivo de las funciones fisiológicas disminuyendo la capacidad del organismo para mantener la homeostasis y aumentando, en consecuencia, la susceptibilidad del organismo a la enfermedad y la muerte (Harman 2001, Lakatta 2015). Por este motivo, las intervenciones para tratar y/o prevenir las alteraciones cardiovasculares asociadas al envejecimiento no sólo mejorarían el estado de salud de los ancianos, sino que también podrían prolongar la esperanza de vida al retrasar las muertes relacionadas con las ECV.

1.1 Efectos del envejecimiento sobre el corazón

Los cambios más drásticos en la función cardíaca que ocurren con el envejecimiento en personas sanas son el aumento del grosor de pared del ventrículo izquierdo, las alteraciones en el patrón de llenado diastólico y la disminución en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, así como alteraciones en el ritmo cardíaco, lo que conlleva a que la prevalencia de insuficiencia cardíaca aumente notablemente con la edad (Wei 1992). Estas alteraciones se deben, al menos en parte, a

una disminución en el número de cardiomiocitos en el corazón por necrosis y apoptosis, así como a una hipertrofia de los mismos y fibrosis del tejido cardíaco debido a un aumento del colágeno debido a alteraciones en la matriz extracelular (MEC) (Masson, Staszewsky et al. 2004).

La MEC es un conjunto complejo de proteínas situadas fuera de las células que proporciona apoyo estructural y biológico a las células circundantes. Los fibroblastos cardíacos son la fuentes primarias de las proteínas de la MEC cardíacas, incluyendo los tipos de colágeno I, II, III, IV, V y VI, elastina, fibronectina, laminina y fibrinógeno (DeQuach, Mezzano et al. 2010). La MEC cardíaca alinea los cardiomiocitos y proporciona soporte estructural al corazón; Sin embargo, la deposición excesiva de colágeno aumenta la rigidez del miocardio y media la disfunción diastólica (Ouzounian, Lee et al. 2008). La MEC está sujeta a un continuo remodelado, existiendo un equilibrio muy estrecho entre la síntesis y degradación de proteínas de la MEC en el que intervienen las metaloproteinasas de matriz (MMPs) como las MMP-3, 8, 9 y 12 (proteasas dependientes de zinc que se encargan de la proteólisis de las proteínas que conforman la MEC) y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) 3 y 4 (Bonnema, Webb et al. 2007).

En general el envejecimiento cardíaco se asocia con un desequilibrio entre la síntesis y degradación de MEC lo que, en muchos casos, deriva en procesos fibróticos. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1) es un factor profibrótico que inhibe la degradación de la matriz, disminuyendo la actividad de las MMPs y aumentando la de las TIMPs (Bujak and Frangogiannis 2007). En el envejecimiento, la expresión de TGF- β 1 está aumentada lo que induce la síntesis y secreción de colágeno por parte de los fibroblastos cardíacos en el espacio intersticial (Shivakumar, Dostal et al. 2003, Wang, Zhang et al. 2010). Sin embargo, una disminución en la expresión de TGF- β 1 da como resultado una reducción de la fibrosis cardíaca asociada al envejecimiento y una mejora en la elasticidad del ventrículo izquierdo (Brooks and Conrad 2000).

Estos cambios estructurales afectan a la función cardíaca ya que repercuten en la contractilidad del miocardio, en la propagación de la contracción y la relajación del corazón, y en la sensibilidad

al calcio, aumentándose por tanto el riesgo de padecer arritmias (Capasso, Palackal et al. 1990) (Figura 1).

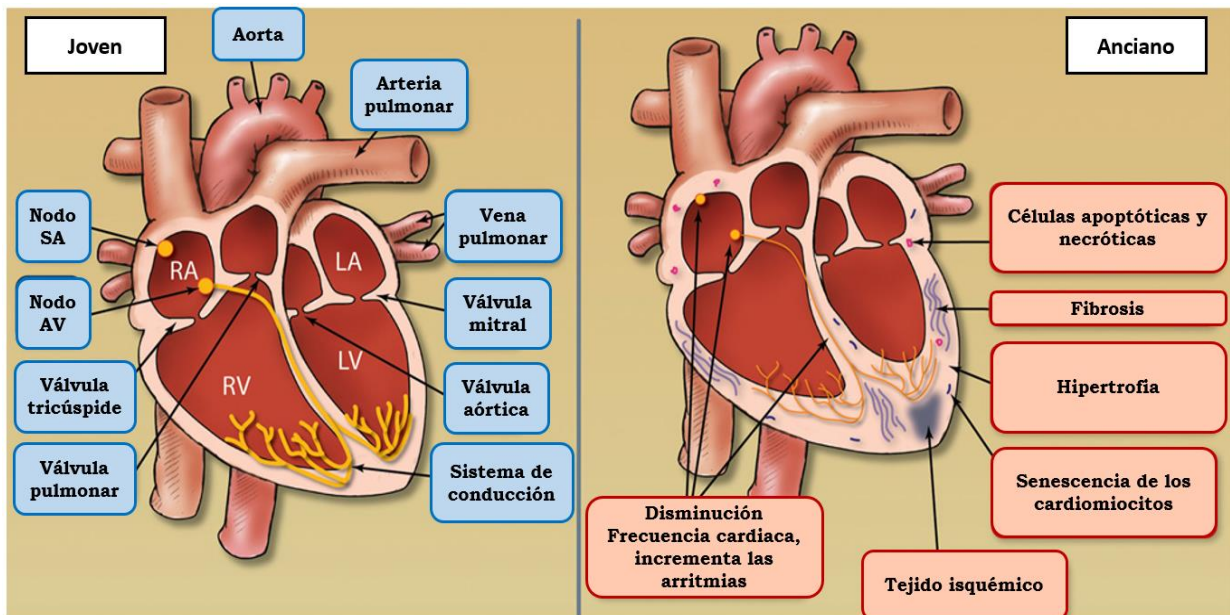


Figura 1. Efectos del envejecimiento en el corazón. Imagen adaptada de (North and Sinclair 2012).

1.2 Efectos del envejecimiento sobre la vasculatura

La edad induce cambios en la estructura y función arterial (Harvey, Montezano et al. 2015). Las dos principales alteraciones vasculares que se desarrollan con el envejecimiento son la rigidez vascular y la disfunción endotelial (Ungvari, Parrado-Fernandez et al. 2008).

La rigidez vascular tiene como consecuencia, por un lado, un aumento de la postcarga del corazón lo que a largo plazo puede derivar en hipertrofia ventricular (London, Covic et al. 2011) y, por otro, una disminución de la perfusión de las arterias coronarias, lo que aumenta el riesgo de padecer isquemia (Kass 2002). Estas alteraciones hemodinámicas se deben en gran parte a cambios estructurales en las paredes de las arterias que consisten principalmente en un engrosamiento de la capa íntima y media de los vasos sanguíneos. Este engrosamiento es debido a la pérdida de elastina, la calcificación de la pared vascular y a un aumento en el número de fibras de fibronectina y colágeno (Atkinson 2008, Lee and Oh 2010). El aumento en la cantidad de fibronectina y colágeno se asocia con un aumento del TGF- β 1, citoquina profibrótica que estimula la síntesis de la fibras de

la MEC (Masson, Staszewsky et al. 2004) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-).

Además de alteraciones estructurales en la pared de los vasos el envejecimiento cursa también con alteraciones en la función endotelial.

El endotelio es el principal regulador del tono vascular, ya que libera sustancias vasoactivas con función vasodilatadora hacia las células musculares lisas vasculares (CMLV) subyacentes como el óxido nítrico (NO), las prostaciclina o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y con función vasoconstrictora como el prostanoide tromboxano A_2 o la endotelina-1 (ET-1) (Tolins, Shultz et al. 1991, Bellien, Thuillez et al. 2008).

En condiciones fisiológicas, los factores hemodinámicos (flujo y presión sanguínea) son los principales encargados de la regulación de la función del endotelio (Busse and Fleming 1998, Davis and Hill 1999). Sin embargo, la función endotelial no sólo depende de los cambios físicos sino también de los cambios locales en la concentración de factores químicos como neurotransmisores (acetilcolina (ACh), catecolaminas, etc.) y hormonas (angiotensina, vasopresina, bradiquinina, etc.) (Vanhoutte 1989) los cuales, dependiendo del lecho vascular y las condiciones, pueden producir efectos vasodilatadores o vasoconstrictores (Rubanyi and Vanhoutte 1985, Katusic and Vanhoutte 1986, Shimizu, Ishii et al. 1994).

La disfunción endotelial se define como la pérdida de la capacidad del endotelio para modular el comportamiento fisiológico del lecho vascular. Diversos estudios han demostrado un aumento de la disfunción endotelial durante el envejecimiento tanto en individuos hipertensos como en normotensos (Taddei, Virdis et al. 2001). Entre las alteraciones endoteliales inducidas por el envejecimiento, se ha descrito una disminución de la relajación dependiente de endotelio, debido a una alteración en la biodisponibilidad del NO a causa de un aumento de la inflamación y del estrés oxidativo (Ungvari, Parrado-Fernandez et al. 2008) y a una disminución en la liberación de EDHF (Fujii, Ohmori et al. 1993, Nakashima and Vanhoutte 1996), además de un aumento de la liberación

de sustancias vasoconstrictoras derivadas de la ciclooxigenasa (COX) como la prostaglandina H_2 (PGH_2), la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), el tromboxano A_2 (TXA_2) (Küng and Lüscher 1995, Heymes, Habib et al. 2000) o la ET-1 (Goettsch, Lattmann et al. 2001). Diversos estudios han encontrado una disminución de la biodisponibilidad de NO asociado con un aumento de la síntesis de ET-1 y viceversa, lo que sugiere que la ET-1 y el NO se regulan recíprocamente a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Boulanger and Lüscher 1990, Rossi, Seccia et al. 2001).

1.3 Inflamación y estrés oxidativo

El envejecimiento cursa con un aumento en la producción ROS y con una disminución de la actividad de los mecanismos anti-oxidantes (Wu, Xia et al. 2014) tanto en el corazón (Judge, Jang et al. 2005) como en la vasculatura (Ungvari, Orosz et al. 2007). Por otra parte, el envejecimiento se asocia con un estado inflamatorio crónico de bajo grado (Franceschi, Bonafè et al. 2000), que hace a los individuos de avanzada edad más susceptibles al desarrollo de enfermedades (Reuben, Cheh et al. 2002, Candore, Caruso et al. 2010), especialmente las ECV (Volpato, Guralnik et al. 2001, Cesari, Penninx et al. 2003, Schiffrin 2014). Entre los distintos marcadores inflamatorios asociados a eventos cardiovasculares, destacan la interleucina-6 (IL-6), la proteína C reactiva (PRC) y el factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α) los cuales, según el estudio Health ABS (Coppé, Patil et al. 2010) tienen un alto valor pronóstico en la aparición de eventos cardiovasculares. Asimismo, se ha propuesto que tanto el TNF- α como la IL-6 se asocian con la gravedad de la disfunción ventricular izquierda y con el grado de activación de los sistemas simpático y renina-angiotensina-aldosterona (Cesari, Penninx et al. 2003).

Además, la inflamación de bajo grado ejerce un efecto perjudicial aditivo sobre la rigidez vascular acelerando así el proceso de envejecimiento vascular (Tsioufis, Dimitriadis et al. 2007). El TNF- α activa un perfil de expresión génica proinflamatorio en las células endoteliales que promueve la adherencia de los monocitos y su migración hacia la capa subendotelial. En modelos animales de envejecimiento, hay infiltración de células inflamatorias como monocitos y macrófagos

en la adventicia de los vasos sanguíneos (Kirstein, Brett et al. 1990). Los monocitos y los macrófagos vasculares, aumentan la producción de ROS a través de la activación de NADPH oxidasa, así como la expresión de citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión, reduciendo la biodisponibilidad del NO, estimulando la hipertrofia de las CMLV y activando las MMPs que conducen a disfunción y remodelación vascular (Touyz 2004, Dawood and Schlaich 2009).

2. ENDOTELINA-1

La ET-1 es considerada como uno de los vasoconstrictores endógenos más potentes producido en el organismo (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). En condiciones normales, la liberación de ET-1 es pequeña mientras que sus niveles aumentan en situaciones patológicas en las que existe un trastorno de la función endotelial como la diabetes (Sármán, Tóth et al. 1998), la hipertensión (Dhaun, Goddard et al. 2008), la isquemia-reperfusión (Hasdai, Kornowski et al. 1994) la aterosclerosis (Bousette and Giaid 2003) o el envejecimiento (Komatsumoto and Nara 1995).

2.1 Estructura y síntesis

La ET-1 es un péptido de 21 aminoácidos sintetizado principalmente por el endotelio vascular y en menor medida por las CMLV. Se sintetiza en el interior de las células mediante 2 pasos proteolíticos a partir de la prepro-ET-1, un precursor peptídico de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos. En primer lugar, una endopeptidasa neutra de tipo furina escinde la prepro-ET-1 a Big-ET-1, un péptido inactivo de 41 residuos de aminoácidos (Denault, Claing et al. 1995). En segundo lugar, la Big-ET-1 se escinde por las enzimas de conversión de la endotelina tipo 1 y 2 (ECE-1 y ECE-2) dando lugar a la ET-1 que es el péptido biológicamente activo (Inoue, Yanagisawa et al. 1989).

2.2 Receptores y mecanismo de acción

Los efectos de la ET-1 están mediados a través de dos tipos de receptores, los receptores de tipo A (ET_A) y los receptores de tipo B (ET_B). Ambos receptores están formados por 7 dominios transmembrana y pertenecen a la superfamilia de receptores ligados a proteínas G (Levin 1995). Fisiológicamente los receptores ET_A y ET_B tienen efectos antagónicos, ya que los ET_A promueven los efectos vasoconstrictores de la ET-1, mientras que los ET_B promueven principalmente efectos vasodilatadores (Thorin and Clozel 2010).

- **Receptores ET_A:** El receptor de endotelina ET_A se expresa abundantemente en las CMLV y en los cardiomiocitos. La ET-1 se une al receptor ET_A induciendo la activación de la fosfolipasa C (PLC), la cual produce el aumento de la concentración de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) en el citoplasma celular.
 - Efectos en los vasos: En las CMLV, el aumento en los niveles de IP₃ estimula la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico produciendo el efecto vasoconstrictor. Por otro lado, el DAG activa la protein quinasa C (PKC) y refuerza la vasoconstricción a través de la vía de la protein quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Maczewski and Beresewicz 2000). Se sabe que el efecto vasoconstrictor inducido por ET-1 persiste incluso después de que la ET-1 haya sido eliminada del receptor, probablemente debido a que la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) permanece elevada (Clarke, Benjamin et al. 1989) (Figura 2).
 - Efectos en el corazón: En los cardiomiocitos la unión de la ET-1 a receptores de tipo ET_A produce un aumento de la contractilidad cardíaca, es decir, tiene un efecto inotrópico positivo (MacCarthy, Grocott-Mason et al. 2000, Namekata, Fujiki et al. 2008). No está claro si el IP₃ juega un papel en las modificaciones de las [Ca²⁺]_i; Sin embargo, se sabe que la ET-1 induce la activación y translocación de la PKC, muy probablemente a través de DAG, y esto puede conducir a un aumento de la [Ca²⁺]_i

(Clerk, Bogoyevitch et al. 1994). Asimismo, la PKC puede estimular directamente el intercambio de Na^+/H^+ , conduciendo a un aumento de la concentración intracelular de Na^+ (Endoh, Fujita et al. 1998), lo que podría aumentar la contractilidad mediante un aumento de sensibilidad de las proteínas contráctiles a Ca^{2+} (Cingolani, Pérez et al. 2005) (Figura 3).

- **Receptores ET_B :** El receptor de endotelina ET_B se expresa predominantemente en células endoteliales y, en mucha menor densidad, en las CMLV y en los cardiomiocitos (Levin 1995, Kohan, Rossi et al. 2011).
 - Efectos en los vasos: En las células endoteliales, la activación del receptor ET_B estimula la liberación de NO y/o prostaciclina, incrementando la formación de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc) respectivamente, produciendo así el efecto vasodilatador (Guan, VanBeusecum et al. 2015). Sin embargo, la activación del receptor ET_B en las CMLV produce vasoconstricción. El efecto predominante parece depender de las concentraciones de ET-1 habiéndose descrito que bajas concentraciones de ET-1 activan a los receptores ET_B del endotelio produciendo vasodilatación, mientras que elevadas concentraciones de ET-1 activan a los receptores ET_B expresados en las CMLV vasculares produciendo vasoconstricción (Guan, VanBeusecum et al. 2015) (Figura 2).
 - Efectos en el corazón: En los cardiomiocitos el papel de los receptores ET_B es controvertido ya que se ha descrito que la activación de ET_B puede producir tanto una inotropía positiva como negativa dependiendo de las situaciones (Kohan, Rossi et al. 2011).

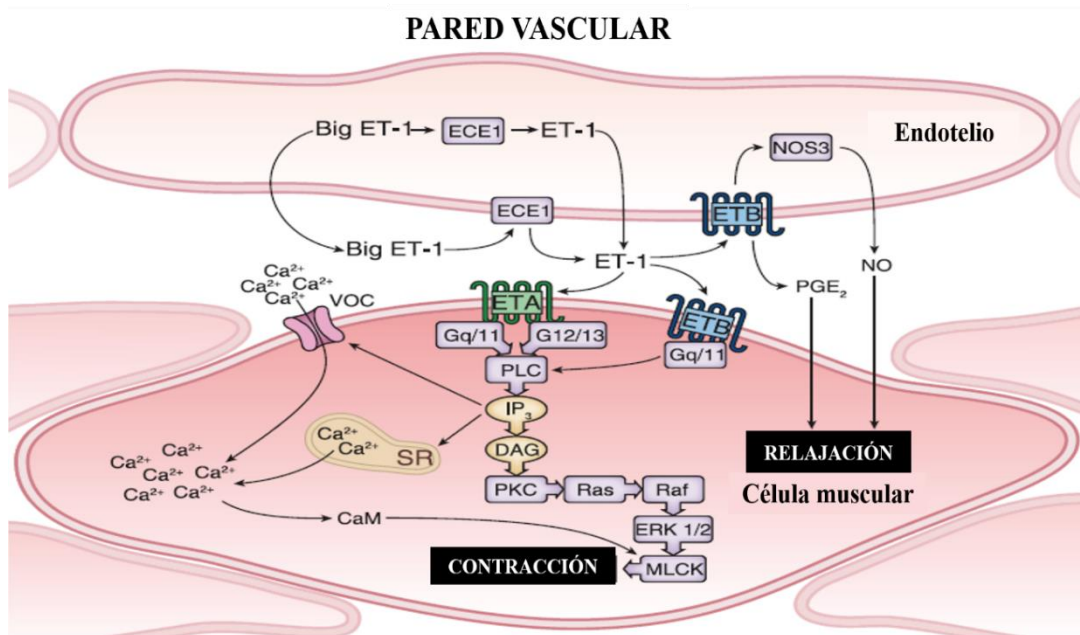


Figura 2. Esquema del mecanismo de acción de la endotelina en las células endoteliales y CMLV. Imagen adaptada de (Kohan, Rossi et al. 2011).

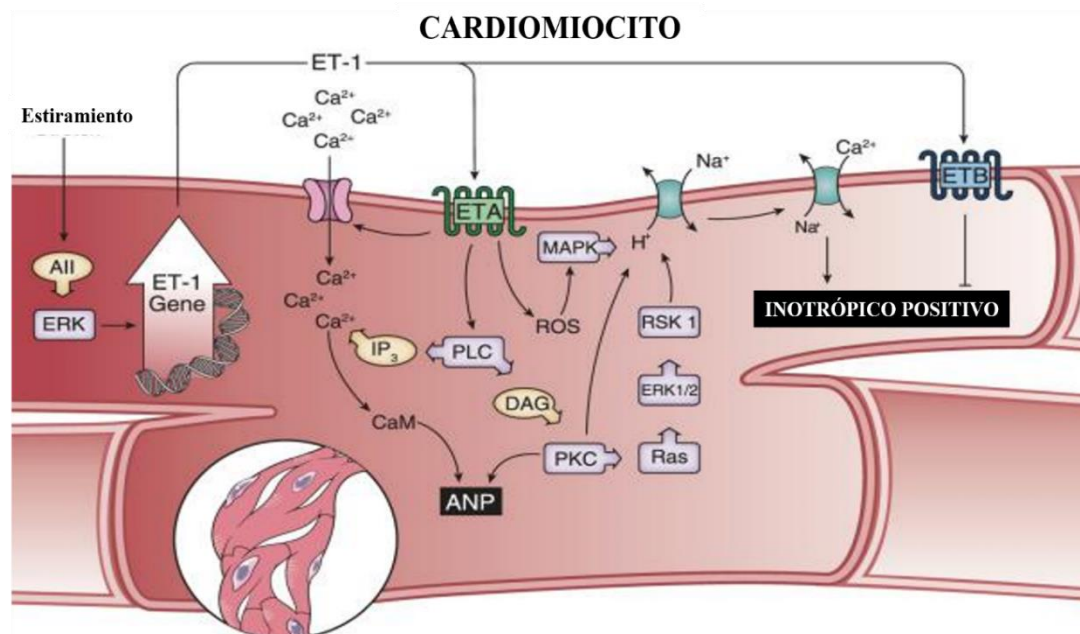


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de la endotelina los cardiomiocitos. Imagen adaptada de (Kohan, Rossi et al. 2011).

2.3 Otros efectos de la ET-1

Además de sus efectos sobre el tono vascular, la ET-1 tiene una acción mitogénica ya que estimula el crecimiento y la proliferación de las CMLV (Komuro, Kurihara et al. 1988) a partir de la producción endógena de ET-1 por el propio tejido muscular (acción autocrina) (Alberts, Peifley et al. 1994). Dicho efecto parece estar mediado principalmente por los receptores ET_A (Alberts, Peifley et al. 1994, Lüscher and Barton 2000) y la activación de la vía de señalización intracelular de las MAPKs (Xia and Karmazyn 2004), aunque podrían participar también en cierta medida los receptores ET_B (Alberts, Peifley et al. 1994, von Essen, Ostermaier et al. 1997).

Por otro lado, la ET-1 juega un papel en los procesos inflamatorios y de remodelado de la pared vascular, habiéndose descrito que concentraciones elevadas de este péptido inducen la activación de macrófagos (Haller, Schaberg et al. 1991) que liberan mediadores inflamatorios (Agui, Xin et al. 1994, Hofman, Chen et al. 1998), factores de crecimiento (Peifley and Winkles 1998) y quimiotácticos como el TNF- α , la interleuquina 1 (IL-1), -6 o la -8. Estos factores promueven la adhesión de neutrófilos (López Farré, Riesco et al. 1993), la producción de colágeno por parte de los fibroblastos, y modulan la síntesis de la MEC (Guidry and Hook 1991, Marini, Carpi et al. 1996) produciendo hipertrofia de las CMLV y del miocardio (Thorin and Clozel 2010).

2.4 Efectos de la ET-1 en el envejecimiento

El envejecimiento cursa con un aumento tanto de los niveles plasmáticos (Miyauchi, Yanagisawa et al. 1992, Nyberg, Mortensen et al. 2013) y de la expresión local de ET-1 en el corazón (Iemitsu, Miyauchi et al. 2002) y en las células endoteliales (Opalach, Rangaraju et al. 2010). Estas evidencias sugieren que este péptido puede jugar un papel importante en las alteraciones cardiovasculares asociadas al envejecimiento.

Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a los niveles de expresión de la ET-1 en los vasos sanguíneos durante el envejecimiento, ya que se ha descrito tanto un aumento en diferentes lechos vasculares como la aorta (Barton, Cosentino et al. 1997), las arterias coronarias (Goodwin,

Amrani et al. 1999, Korzick, Muller-Delp et al. 2005), las arteriolas de la retina (MacIntyre, Slusar et al. 2012) y la vasculatura renal (Goettsch, Lattmann et al. 2001), como una disminución en la síntesis de ET-1 en la aorta (Facchetti, Monzani et al. 2007). No obstante, lo que sí parece claro es que en la mayoría de los lechos vasculares el aumento de los niveles de ET-1 induce rigidez arterial, favoreciendo el desarrollo de complicaciones cardiovasculares como la aterosclerosis, el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular y la lesión renal (Goettsch, Lattmann et al. 2001).

La ET-1 se ha propuesto como un péptido importante en el desarrollo de la enfermedad renal asociada al envejecimiento (Kohan and Barton 2014) ya que la respuesta contráctil a la ET-1 aumenta con el envejecimiento (Meyer, Barton et al. 2014), lo que conduce a una reducción de la perfusión renal y la posterior activación del sistema renina-angiotensina (SRA), contribuyendo así a un aumento de la presión arterial (Barton, Cosentino et al. 1997, Kohan, Rossi et al. 2011).

Además, el envejecimiento se asocia con modificaciones en la densidad total de los receptores para ET-1 (Afiatpour, Latifpour et al. 2003, Yono, Latifpour et al. 2004), así como en la relación entre ET_A:ET_B, (Del Ry, Maltinti et al. 2008). En este sentido, se ha descrito que la relación ET_A:ET_B en el corazón de ratas jóvenes es de 2:1, mientras que con el envejecimiento pasa a ser de 3:1, lo que podría estar asociado al desarrollo de ECV (Del Ry, Maltinti et al. 2008).

3. INSULINA

3.1 Estructura y síntesis

La insulina es una hormona polipeptídica que está formada por una cadena A, compuesta por 21 aminoácidos con un enlace disulfuro intracadena (A6-A11), unida a una cadena B compuesta por 30 residuos de aminoácidos. Ambas cadenas se encuentran unidas entre sí mediante puentes disulfuro en residuos de cisteína (A7-B7 y A20-B19) (Hutton 1994, Davidson 2004) (Figura 4).

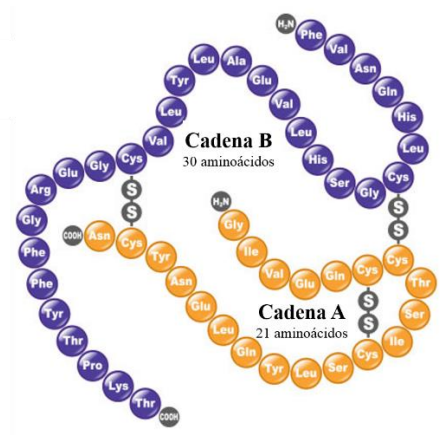


Figura 4. Molécula de insulina. Imagen adaptada de <https://www.healthexpress.eu/de/janumet.html>

La insulina se codifica en el brazo corto del cromosoma 11 y es sintetizada y secretada por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a un aumento de la concentración plasmática de glucosa. El aumento de la glucemia provoca en estas células un aumento de los niveles de AMPc, que ejerce sus efectos a través de un mecanismo que implica la proteína quinasa A (PKA), dando lugar a la fosforilación y la activación de ciertas proteínas clave. A través de esta compleja cadena de eventos, la glucosa y el AMPc (y posiblemente las contribuciones del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ e IP_3) aumentan rápidamente la traducción y la transcripción del ARNm de la insulina (Pittman, Philipson et al. 2004).

La insulina se sintetiza como preproinsulina en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso, donde el péptido señal se escinde y los residuos de cisteína de las cadenas de insulina A y B se oxidan para formar enlaces disulfuro entre las dos cadenas (Hutton 1994, Davidson 2004), dando lugar a la proinsulina. Esta proteína precursora contiene tanto la cadena A como la cadena B de la insulina en una cadena única continua unida a través de un segmento intermedio denominado péptido C. La proinsulina es transportada al aparato de Golgi donde se almacena en gránulos secretorios situados cerca de la membrana celular. Posteriormente, mediante una escisión proteolítica por la prohormona convertasa 2 en el sitio 65/66 y por la prohormona convertasa 1/3 en el sitio 32/33, la proinsulina se escinde en insulina y péptido C (Figura 5) (Zhu, Orci et al. 2002).

Finalmente, la cadena B de insulina y el péptido C son procesados por el carboxipeptidasa E para eliminar los residuos básicos terminales y formar los péptidos maduros de insulina y péptido C (Zhu, Orci et al. 2002).

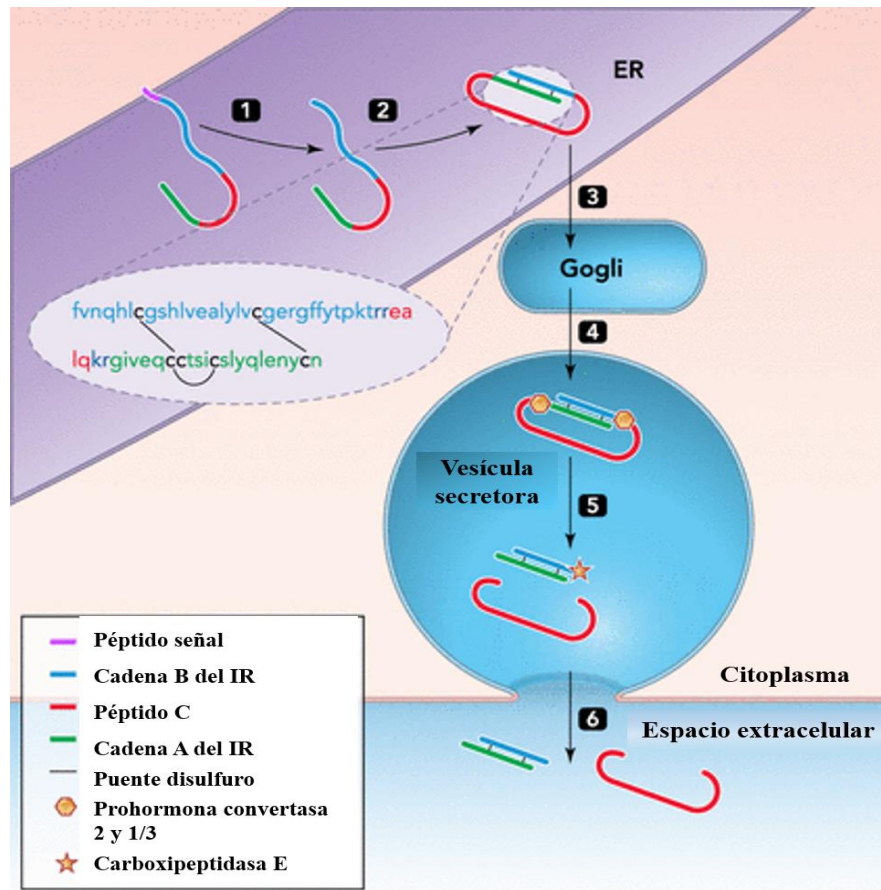


Figura 5. Procesamiento de la insulina y péptido C. Imagen adaptada de (Yosten and Kolar 2015).

La insulina y el péptido C se almacenan en las vesículas secretoras hasta la estimulación de las células β pancreáticas por elevaciones en la concentración extracelular de glucosa.

Cuando los niveles plasmáticos de glucosa son bajos (0-3 mM), las células β tienen un potencial de membrana en reposo de -60 Mv. Cuando la glucosa plasmática aumenta por encima de 3 mM, ésta es captada por los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT-2) situados en la membrana de las células β (Mueckler 1994). Una vez en el interior celular, la glucosa es fosforilada por la enzima glucoquinasa, convirtiéndose en glucosa-6 fosfato que posteriormente se metaboliza, oxidándose

mediante la glucólisis para la generación de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). De este modo, el balance entre ATP/ADP se ve favorecido hacia la formación de ATP, lo que provoca una inactivación de los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}), que se cierran impidiendo la salida de K^+ de la célula β pancreática. De esta forma el interior celular queda con un exceso de cargas positivas generándose potenciales de acción superpuestos que despolarizan la membrana celular. Cuando se alcanza el umbral de -55 mV, se produce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la membrana plasmática, a través de los cuales se produce la entrada de iones Ca^{2+} al interior celular. Se produce así un aumento de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, provocando la liberación simultánea de insulina y péptido C de sus gránulos de almacenamiento por exocitosis al espacio extracelular, y su difusión hacia vasos sanguíneos cercanos (Humana 2005) (Figura 6).

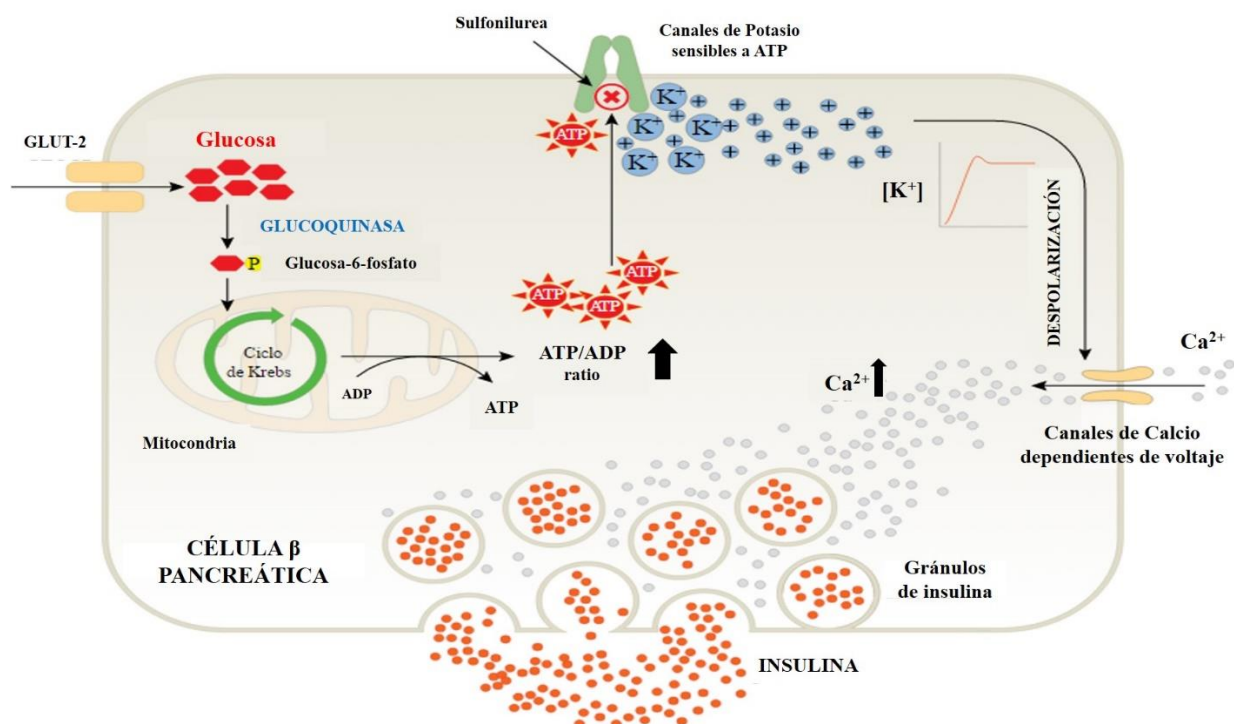


Figura 6. Proceso de secreción de insulina en las células β pancreáticas como respuesta al aumento de los niveles de glucosa sanguíneos. Imagen adaptada de (MacDonald and Wheeler 2003).

3.2 Mecanismo de acción

La insulina es un ligando que activa un receptor celular de membrana, denominado receptor de insulina (IR). El IR pertenece a la superfamilia de receptores tirosin quinasa cuya activación modula múltiples vías de señalización post-receptor. Está compuesto por dos subunidades α extracelulares que contienen el sitio de unión para la insulina que se encuentran unidas por puentes disulfuro a dos subunidades β . Estas últimas están formadas por una región extracelular, otra región transmembrana y una porción intracelular. La porción intracelular de la subunidad β contiene un dominio tirosin quinasa que está inactivo en ausencia de ligando, debido a que la subunidad α lo inhibe. La unión de la insulina a las subunidades α permite que los dominios quinasa de las subunidades β entren en contacto mediante un cambio conformacional y se activen por transfosforilación, dando como resultado la fosforilación de residuos de tirosina (Tyr) específicos en la parte intracelular del receptor fuera del dominio quinasa en las posiciones Tyr⁹⁶⁵, Tyr⁹⁷², Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁶³, Tyr¹³²⁸ y Tyr¹³³⁴. Estos residuos fosforilados se convierten en sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH2 (dominios con una elevada afinidad por los residuos de tirosina fosforilada), que también se fosforilan por la quinasa o son activados por cambios conformacionales e inician la cascada de transducción de señales intracelulares (Patti and Kahn 1998, De Meyts 2008) (Figura 7).

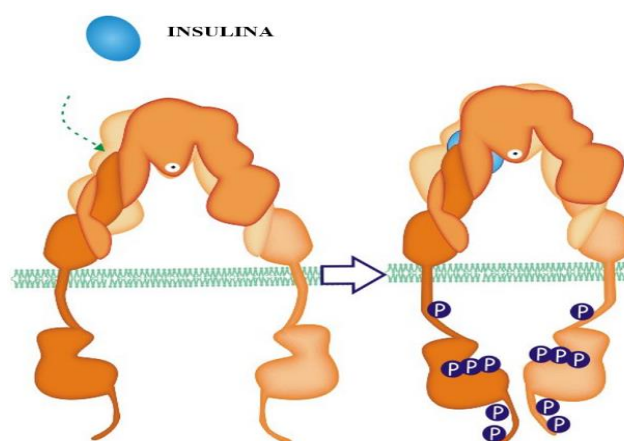


Figura 7. Activación del receptor de insulina. La unión de la insulina al dímero del receptor induce un cambio conformacional que causa la transfosforilación del segmento de activación del dominio de proteína quinasa en determinados residuos de tirosina. La fosforilación adicional sigue a ambos lados del dominio catalítico. Imagen adaptada de <http://www.cellbiol.net/ste/rpimages.php>.

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se activan dos cascadas de señalización intracelular: la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de la MAPK (Avruch 1998).

- **Vía PI3K/Akt:** Esta vía es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos. La transducción de señales se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con el sustrato del receptor de insulina (IRS) y lo fosforila. Aunque existen 4 isoformas de IRS, la que está involucrada en el transporte de glucosa a las células es la isoforma 1 (IRS-1). A continuación, el IRS-1 fosforilado se une a la enzima PI3K y la activa mediante otra fosforilación. Las PI3Ks, son heterodímeros formados por una subunidad reguladora (p85), que permite su unión a las proteínas IRS-1, y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 resulta en la activación de la subunidad p110 y en consecuencia, dicha subunidad p110 tiene acceso a su sustrato fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP₃), que sirve como sitio de unión para quinasas de Serina (Ser) como PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositidos-1) y Akt (Figura. 8). En el caso de la quinasa Akt, después de su reclutamiento a la membrana plasmática ésta es fosforilada en dos residuos, la Ser⁴⁷³ y la Thr³⁰⁸, lo que resulta en su activación (McCarthy and Elmendorf 2007). En la mayoría de los tejidos la activación de la enzima Akt media, a través de la fosforilación de una lista de diferentes sustratos, varios de los efectos de la insulina como la disminución de apoptosis, el aumento de la síntesis de glucógeno, de proteínas, de la adipogénesis y de la absorción de glucosa mediante la translocación de los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT-4) a la membrana plasmática (Figura 8). En cambio, en el endotelio vascular, la activación de Akt da lugar a la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), mediante fosforilación en el residuo

Ser¹¹⁷⁷, induciendo así un aumento de la producción de NO en cuestión de minutos (Zeng, Nystrom et al. 2000, Montagnani, Chen et al. 2001) (Figura 10).

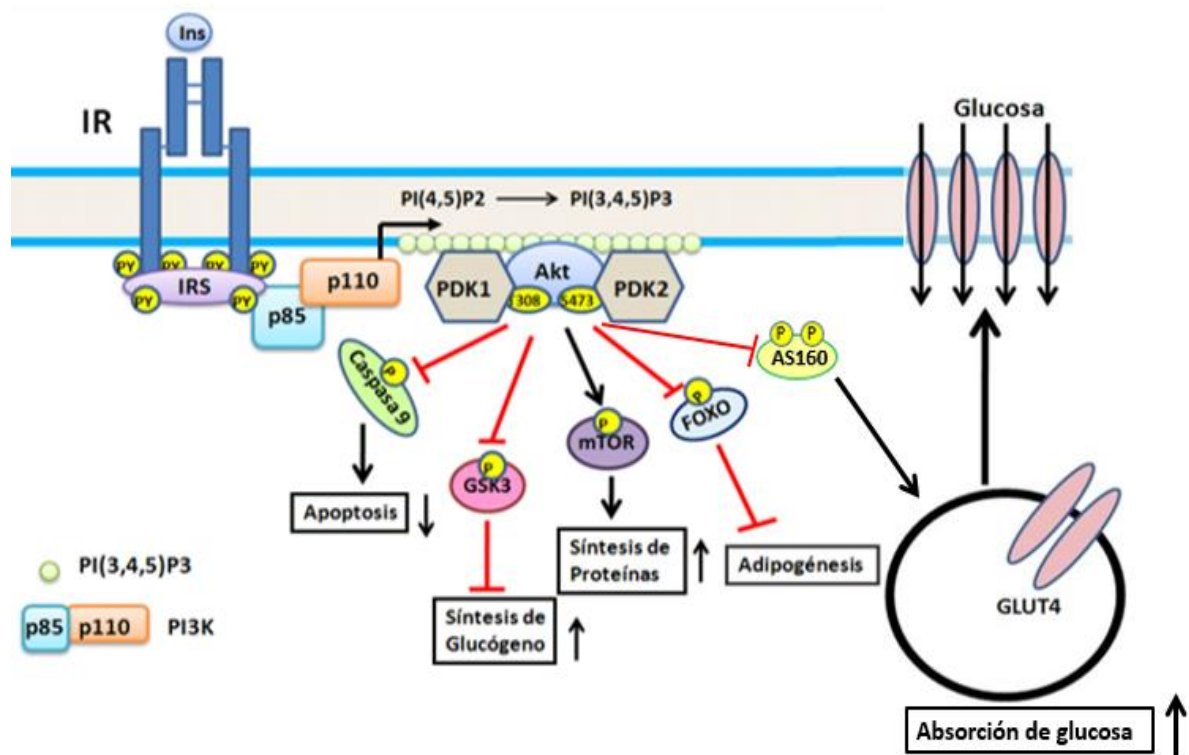


Figura 8. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. Estos efectos se llevan a cabo, en su mayoría, en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado. Imagen adaptada de (Reyes and Plancarte 2008).

- **Vía MAPK:** Tras la unión del ligando a las subunidades α del IR, la fosforilación en el residuo Tyr⁹⁷² del dominio citoplasmático del IR promueve el anclaje de la proteína Shc, la cual se une al complejo Grb2/SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina capaz de activar a la proteína RAS. La activación de RAS, hace que se una y active a RAF-1, que fosforila y activa a MEK que, en última instancia, fosforila y activa a MAPK (Reusch, Bhuripanyo et al. 1995, Nystrom and Quon 1999). En los tejidos insulino-dependientes esta vía, no participa en la regulación del transporte de glucosa, sino que está involucrada en la regulación de la expresión de genes implicados en el crecimiento y la diferenciación celular.

Sin embargo, en las células del endotelio vascular induce la producción de ET-1 (Figura 9) (Avruch 1998).

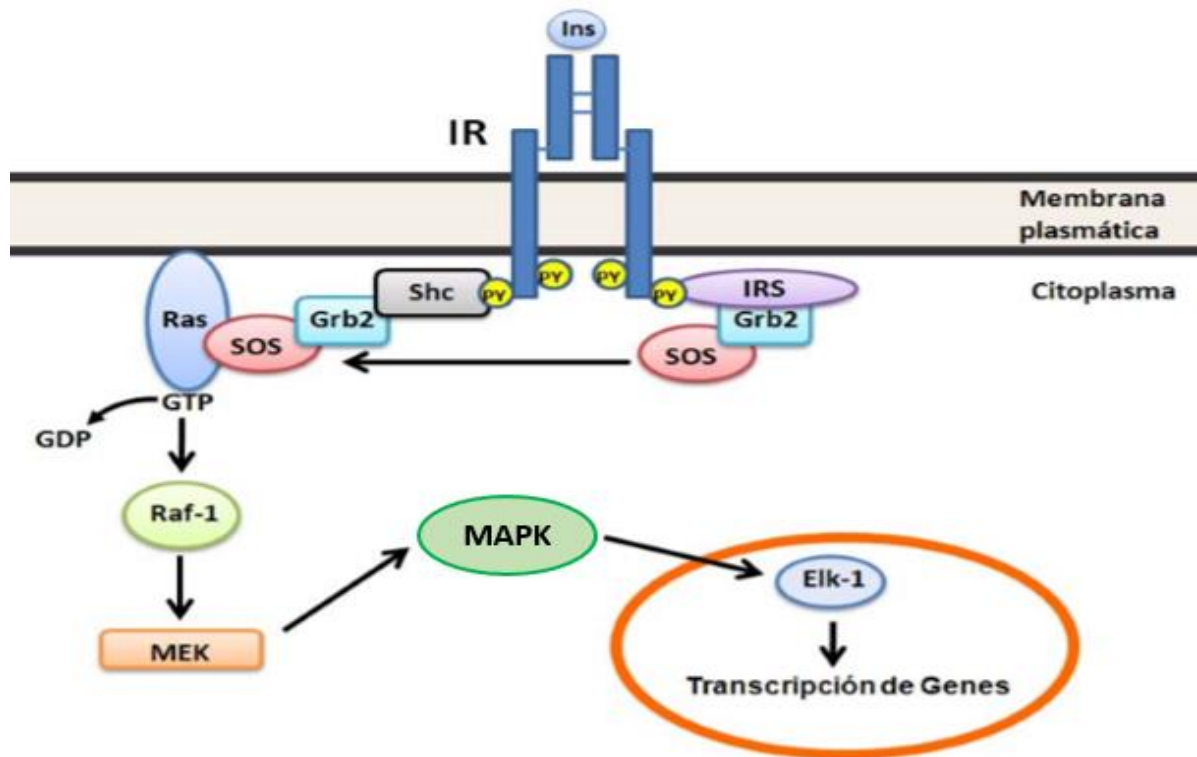


Figura 9. Activación de la vía de la MAPK por la insulina. La vía de señalización de la insulina MAPK generalmente regula el crecimiento y la mitogénesis y controla la secreción de ET-1 en el endotelio vascular. Imagen adaptada de (Reyes and Plancarte 2008).

3.3 Acciones de la insulina

3.3.1 Metabólicas

La principal función de la insulina es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango entre 80-105 mg/dl favoreciendo la entrada y el almacenamiento de este nutriente en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo.

En el hígado la insulina estimula el almacenamiento de glucosa mediante la activación de la enzima glucógeno sintetasa que induce la síntesis de glucógeno como reserva energética, e inhibe la enzima glucógeno fosforilasa, evitando así la glucogenolisis (Cheatham and Kahn 1995, Carnagarin, Dharmarajan et al. 2015).

En el tejido adiposo y el músculo esquelético la insulina estimula la captación de glucosa extracelular mediante la activación de la vía de la PI3K/Akt que, en última estancia, modula el número de transportadores GLUT-4 en la membrana celular mediante su translocación desde las vesículas intracelulares (Bogan and Kandror 2010).

Existen tres isoformas de Akt (Akt1-3), de las cuales, la isoforma 2 (Akt-2) parece ser la responsable de la incorporación de glucosa mediada por la insulina.

En los adipocitos, la insulina estimula, además, la captación de ácidos grasos libres para la síntesis de triglicéridos e inhibe la β -oxidación de ácidos grasos para obtener energía y la formación de cuerpos cetónicos (Cheatham and Kahn 1995).

En el músculo esquelético la insulina estimula la captación de aminoácidos y la síntesis de proteínas e inhibe su catabolismo (Cheatham and Kahn 1995).

Aunque la insulina se considera una hormona reguladora de la homeostasis de la glucosa, actualmente se sabe que tiene un papel pleiotrópico mucho más amplio ya que además de los procesos celulares descritos anteriormente, regula la síntesis de ADN y ARN, así como el crecimiento y la diferenciación celular, lo que le hace ser una hormona fundamental en los procesos de reproducción y supervivencia (White 2015).

3.3.2 Cardiovasculares

3.3.2.1 Acciones de la insulina en los vasos

3.3.2.1.1 Producción de NO y ET-1 en el endotelio

En el endotelio vascular la insulina induce la activación de la eNOS mediante su fosforilación y de forma independiente a los movimientos de Ca^{2+} intracelulares (Takahashi and Mendelsohn 2003). Tal y como detallamos con anterioridad, esta vía requiere la activación del IR cuyo dominio intracelular con actividad tirosin quinasa, fosforila su propio sustrato, IRS-1, que a su vez produce la fosforilación de la subunidad reguladora (p85) de la enzima PI3K. Tras la fosforilación, p85 se une a IRS, induciendo la activación de la subunidad catalítica (p110) de PI3K, la cual fosforila el

PIP₂, que se encuentra formando parte de la bicapa lipídica de la membrana celular, transformándolo en PIP₃ y DAG (Cantley 2002). A continuación, el PIP₃ se une a PDK-1 fosforilándola y ésta, a su vez, produce la fosforilación de la Akt (Alessi, James et al. 1997), la cual tiene actividad serin-treonin quinasa. Finalmente, Akt fosforila a la eNOS en el residuo de Ser¹¹⁷⁷ activándola, de forma que se induce la síntesis de NO por parte de las células endoteliales. Por el contrario, cuando Akt fosforila a la eNOS en la posición Thr⁴⁹⁵, se produce la inhibición de la enzima (Mount, Kemp et al. 2007). En esta cascada de señalización, una proteína que juega un papel fundamental es la proteína *heat shock* 90 (HSP90). La asociación de esta proteína con la eNOS es indispensable para la producción de NO, ya que a pesar de que esta activación es independiente del Ca²⁺, la eNOS necesita unirse a la proteína reguladora calmodulina (CaM), lo que requiere la actuación de HSP90 (Fleming and Busse 2003). Se cree que el mecanismo de acción es mediante la formación de un complejo ternario eNOS-HSP90-Akt que en última instancia induciría la fosforilación de eNOS en la Ser¹¹⁷⁷ (Fleming and Busse 2003, Takahashi and Mendelsohn 2003) (Figura 10).

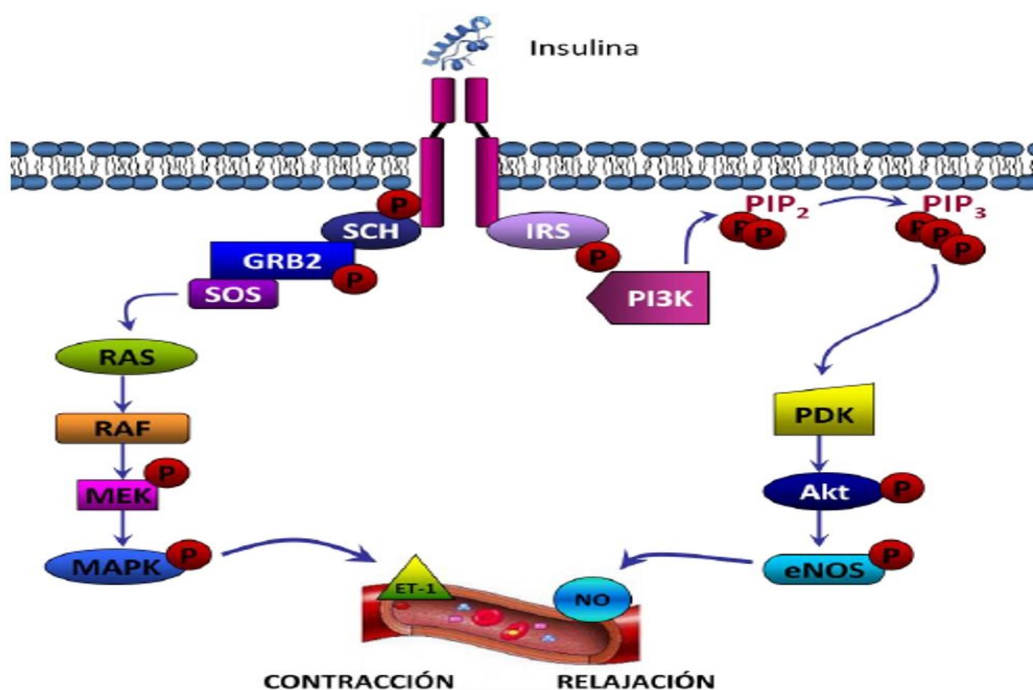


Figura 10. Vías de transducción de la señal de insulina. Imagen adaptada de (Muniyappa, Montagnani et al. 2007).

Estudios recientes en células endoteliales de aorta bovina (BAEC) y de arterias mesentéricas han demostrado que la insulina también estimula la síntesis y secreción de ET-1 a través de la activación de la vía de señalización MAPK (Formoso, Chen et al. 2006) (Figura 9). Igualmente, la activación de esta vía promueve los efectos de la insulina sobre la expresión de las moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1) y E-selectina, las cuales juegan un papel primordial en la modulación de las interacciones célula-célula entre las células inflamatorias circulantes y el endotelio vascular (Montagnani, Ravichandran et al. 2002).

3.3.2.1.2 Efectos de la insulina en las CMLV

En la vasculatura la mayor parte del NO biodisponible se origina principalmente en el endotelio. El NO derivado del endotelio difunde hacia las CMLV donde activa la guanilato ciclasa para aumentar los niveles de GMPc que producen la vasodilatación. Sin embargo, se ha descrito que las CMLV también expresan eNOS, NOS inducible (iNOS), y NOS neuronal (nNOS) (Begum, Ragolia et al. 1998, Boulanger, Heymes et al. 1998, Trovati, Massucco et al. 1999, Brophy, Knoepp et al. 2000), lo que plantea la posibilidad de que la producción de NO en las CMLV pueda actuar de manera autocrina y contribuir a la regulación del tono vascular.

Las CMLV expresan IR (Chisalita and Arnvist 2005) y la unión de la insulina aumenta la actividad NOS (eNOS e iNOS) y la producción de GMP dependiente de NO en estas células (Trovati, Massucco et al. 1995, Begum, Ragolia et al. 1998, Trovati, Massucco et al. 1999, Bergandi, Silvagno et al. 2003). Concentraciones fisiológicas de insulina estimulan la autofosforilación del IR en las CMLV y dan como resultado un rápido aumento de los niveles de GMPc y la consecuente activación de la eNOS (Trovati, Massucco et al. 1995, Kahn, Husid et al. 1997, Trovati, Massucco et al. 1999, Johansson and Arnvist 2006). Estos efectos son bloqueados tanto por la Genisteína (inhibidor de la tirosin quinasa) como por la Wortmanina (inhibidor de la PI3K), lo que sugiere que la tirosin quinasa de las subunidades β del IR y la posterior activación de

la PI3K son necesarias para la regulación de la NOS en respuesta a la insulina en las CMLV (Trovati, Massucco et al. 1995, Begum, Ragolia et al. 1998).

Además de sus efectos sobre la producción de NO, la insulina disminuye la contractilidad de las CMLVs actuando sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y modulando la actividad de las fosfatasas de la cadena ligera de miosina (Standley, Zhang et al. 1991, Kahn, Seidel et al. 1993, Saito, Hori et al. 1993) a través de las enzimas Rho quinasa (RhoK) y PKC (Begum, Duddy et al. 2000).

Sobre los canales de Ca^{2+} se ha descrito que el tratamiento de las CMLV con insulina provoca una disminución en los niveles de Ca^{2+} intracelular al inhibir su entrada y estimular su salida de las células (Standley, Zhang et al. 1991, Muniyappa, Walsh et al. 1997). Este proceso se lleva a cabo mediante una hiperpolarización de la membrana (Berweck, Thieme et al. 1993) a través de la estimulación de bombas de Na^+ (Tirupattur, Ram et al. 1993) y canales K^+ dependientes de Ca^{2+} (Wiecha, Reineker et al. 1998), que tienden a reducir el flujo de Ca^{2+} a través canales voltaje-dependientes (Berweck, Thieme et al. 1993, Tirupattur, Ram et al. 1993, Wiecha, Reineker et al. 1998). La insulina también ejerce esta acción activando las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del retículo sarcoplásmico, disminuyendo así las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmáticas (Kim and Zemel 1993). Los efectos de la insulina sobre el Ca^{2+} intracelular en las CMLV son atenuados tanto por inhibidores de la tirosin quinasa (Genisteína y Tiofosfina A-23) (Touyz and Schiffrin 1996), como por inhibidores de la enzima NOS (Kahn, Husid et al. 1997), por lo que la activación de la vía PI3K/Akt/NOS parece estar implicada en la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la insulina, dando lugar a una disminución del tono vascular.

3.3.2.2 Acciones de la insulina en el corazón

La insulina ejerce efectos directos sobre los cardiomiocitos y sobre las arterias coronarias. En los cardiomiocitos regula el metabolismo cardiaco modulando el transporte de glucosa, la glucólisis, la síntesis de glucógeno, el metabolismo lipídico, la síntesis proteica, el crecimiento, la contractilidad

y la apoptosis (Abel, Litwin et al. 2008) y a nivel coronario ejerce efectos vasodilatadores aumentando la perfusión del miocardio (McNulty, Pfau et al. 2000, Sundell, Laine et al. 2002).

En el corazón aproximadamente un 70% de la energía requerida para la producción de ATP procede de la oxidación de los ácidos grasos y el 30 % restante procede de las rutas metabólicas de la glucosa y el lactato. Además de la captación basal de glucosa cardíaca mediada por el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1), la insulina estimula la captación de glucosa en los cardiomiocitos aumentando la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana plasmática (Abel 2004) y lo hace mediante la activación de la vía PI3K/Akt, estimulando también así la acumulación de glucógeno y la inhibición simultánea de la glucogenolisis (Ouwens, Boer et al. 2005).

Por otro lado, la insulina aumenta la contractilidad cardíaca tanto *in vivo* como en el músculo cardíaco aislado (Maier, Aulbach et al. 1999, Abel 2004, von Lewinski, Bruns et al. 2005), efecto que está mediado por el movimiento transmembrana de Ca^{2+} extracelular a través de la activación de canales de Ca^{2+} tipo L y del intercambio inverso de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este flujo de Ca^{2+} hacia el citoplasma, estimula la liberación adicional de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico a través de receptores de rianodina, lo que da lugar a la activación y contracción de los miofilamentos (Muniyappa, Montagnani et al. 2007). Se ha descrito que los inhibidores de la vía PI3K (Wortmanina o LY294002) inhiben las acciones inotrópicas de la insulina (Maier, Aulbach et al. 1999, McDowell, McCall et al. 2004, von Lewinski, Bruns et al. 2005). Sin embargo, la sobreexpresión de Akt en los cardiomiocitos se asocia con el aumento del Ca^{2+} citoplasmático debido a una mayor entrada de este ion a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y su liberación desde el retículo sarcoplásmico (Latronico, Costinean et al. 2004, Rota, Boni et al. 2005). Si esta sobreexpresión de Akt es crónica deriva en fallo cardíaco (Latronico, Costinean et al. 2004, Rota, Boni et al. 2005).

Además de sus efectos sobre la contractilidad, la insulina estimula la producción de NO en los cardiomiocitos a través de la vía PI3K/Akt/eNOS (Gao, Gao et al. 2002), lo que podría contribuir a los efectos inotrópicos de la insulina (Ren, Sowers et al. 1999).

3.4 Resistencia cardiovascular a la insulina

La resistencia a la insulina se define como una disminución de la sensibilidad y/o respuesta a las acciones de la insulina (Wilcox 2005). Las causas de esta alteración podrían deberse tanto a componentes genéticos como a factores adquiridos, como son la obesidad o el estilo de vida sedentario que, a menudo, preceden a las alteraciones en la tolerancia a la glucosa (DeFronzo and Ferrannini 1991). La resistencia a la insulina es una característica distintiva importante de desórdenes metabólicos como la diabetes *mellitus* tipo 2 (Macdonald 2016), la obesidad (Despres 1992), y las dislipidemias (Jung and Choi 2014), y constituye además un componente importante en algunas ECV como la hipertensión (Grinnan, Farr et al. 2016), la enfermedad arterial coronaria (Syed Ikmal, Zaman Huri et al. 2013), la aterosclerosis (Toth 2014) o las alteraciones cardiovasculares asociadas al envejecimiento (Li, Xiong et al. 2009). Todas estas condiciones se caracterizan por la existencia de disfunción endotelial, por lo que la disfunción endotelial frecuentemente coexiste con la resistencia a insulina, y los factores causales compartidos interactúan a múltiples niveles, generando relaciones recíprocas entre ambos procesos (Kim, Montagnani et al. 2006).

La resistencia a la insulina se asocia con un incremento compensador en la secreción de insulina (hiperinsulinemia) por parte de las células β del páncreas (Shafrir, Ziv et al. 1999). Cuando la secreción de insulina no es capaz de compensar la resistencia que se opone a las acciones de la hormona, se altera la utilización y el almacenamiento de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos y se produce hiperglucemia (Kahn, Allen et al. 1994).

La resistencia a la insulina no sólo se produce en los tejidos insulino-dependientes como el tejido adiposo o el músculo esquelético sino que también afecta al sistema cardiovascular. La resistencia

vascular a la insulina se caracteriza por la alteración específica de la activación de la vía de señalización dependiente de la PI3K, mientras que la activación de la vía de la MAPK permanece inalterada (Jiang, Lin et al. 1999, Cusi, Maezono et al. 2000). Las implicaciones fisiopatológicas de esta alteración selectiva son un desequilibrio entre las acciones vasodilatadoras de la insulina dependientes de la vía PI3K (deprimidas) y las dependientes de la MAPK (no afectadas), favoreciéndose de este modo las acciones prohipertensivas mediadas por la vía MAPK a través de sus acciones proliferativas y de un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y ET-1 (Montagnani, Ravichandran et al. 2002, Potenza, Marasciulo et al. 2005).

Como se ha descrito en apartados anteriores, la activación de la eNOS y la producción de NO en respuesta a la insulina requieren la activación de la vía IR/IRS-1/PI3K/Akt. Los pasos de la vía por encima de la activación de Akt, se solapan con las vías que median la captación de glucosa estimulada por la insulina en los tejidos diana donde la hormona ejerce sus efectos metabólicos (Saltiel and Kahn 2001). La notable similitud entre la vía de señalización metabólica de la insulina, relacionada con la captación de glucosa, y la vía de señalización de la insulina relacionada con la vasodilatación, explica el deterioro paralelo de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a nivel muscular y del tejido adiposo, y el deterioro en la producción endotelial de NO en la vasculatura, bajo condiciones de resistencia a la insulina (Kim, Koh et al. 2005) (Figura 11).

Una consecuencia fisiopatológica directa de la disminución en la producción de NO en situaciones de resistencia a la insulina, es la disminución en el reclutamiento capilar (Clark, Wallis et al. 2003) que desencadena una disminución en la perfusión capilar, lo que reduce la superficie disponible para el intercambio de nutrientes derivando en una menor captación de glucosa en el músculo esquelético (Clark, Wallis et al. 2003). Además, el transporte transendotelial de insulina es un factor limitante para la captación de glucosa dependiente de la insulina en el músculo (Yang, Hope et al. 1989, Miles, Levisetti et al. 1995), por lo que la disminución en el reclutamiento capilar

en situaciones de resistencia a la insulina podría, no sólo reducir la captación de glucosa, sino también deteriorar el propio transporte transendotelial de la insulina hacia músculo (Clark 2008).

Los mecanismos moleculares por los cuales la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia, los elevados niveles de glucosa, la hipertrigliceridemia y la inflamación inducen disfunción endotelial, están interconectados y solapados, por lo que resulta complicado separarlos (Musicki and Burnett 2007). La inflamación, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad en estados dismetabólicos median la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial a través de múltiples mecanismos (Figura 11).

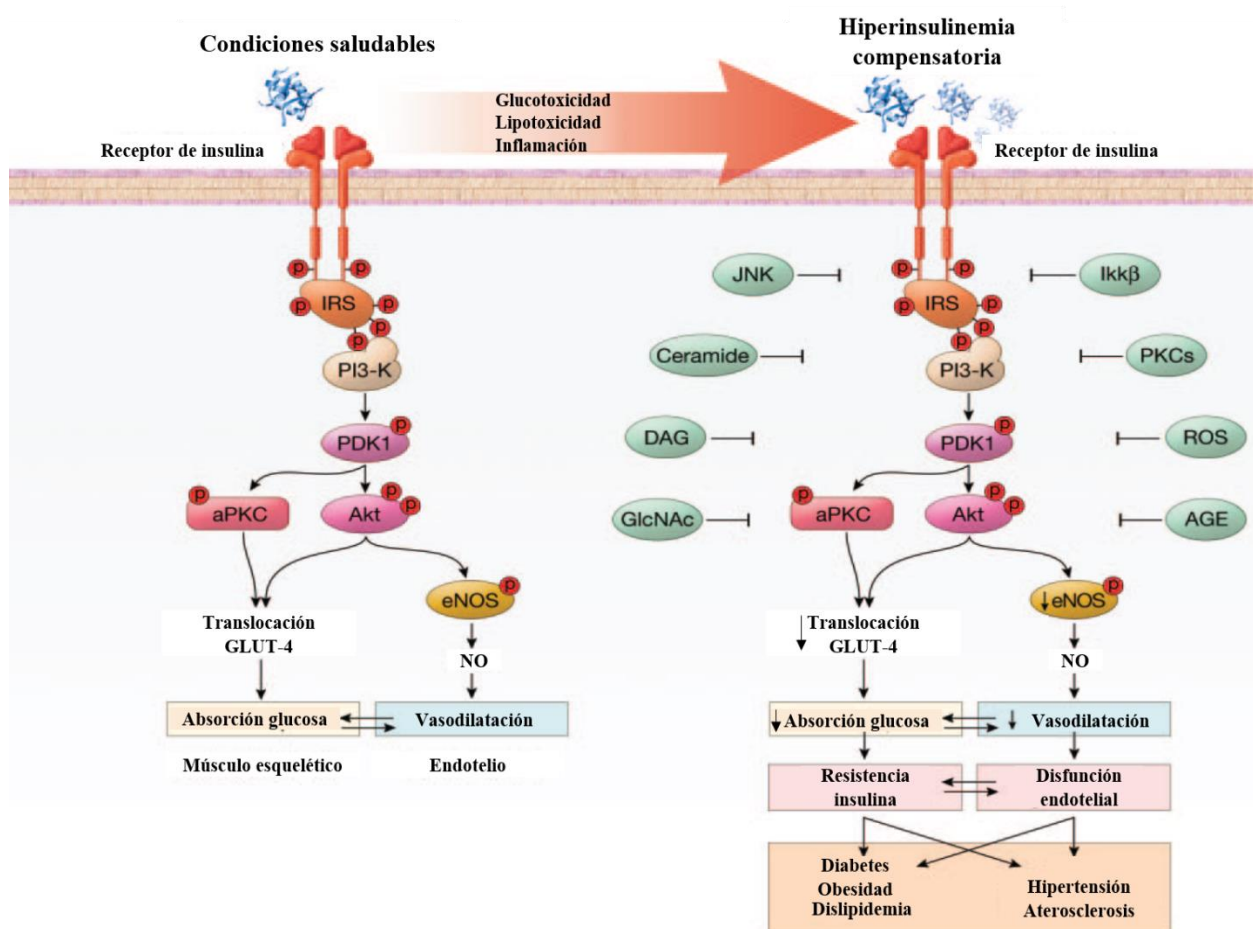


Figura 11. Los mecanismos compartidos y de interacción de la glucotoxicidad, la lipotoxicidad y la inflamación hacen que las relaciones recíprocas entre la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial contribuyan al vínculo entre las enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Imagen adaptada de (Muniyappa, Montagnani et al. 2007).

3.4.1 Mecanismos implicados en la resistencia cardiovascular a la insulina

3.4.1.1 Glucotoxicidad

El control glucémico a largo plazo es un indicador importante de las enfermedades micro y macrovasculares (Haffner 1998). La hiperglucemia altera las acciones metabólicas y vasculares de la insulina por múltiples mecanismos bioquímicos y celulares (Brownlee 2005). Estos incluyen estrés oxidativo elevado, formación de compuestos de glucosilación avanzada (AGEs) y activación de DAG y PKC.

- **Estrés oxidativo:** La hiperglucemia aumenta la producción de ROS. En las células endoteliales expuestas a altas concentraciones de glucosa, la activación en respuesta a la insulina de Akt y eNOS se reduce significativamente (Du, Edelstein et al. 2001, Schnyder, Pittet et al. 2002). Además de disminuir la activación de las vías de señalización de la insulina, las ROS disminuyen la biodisponibilidad de NO, reducen los niveles de tetrahidrobiopterina (BH₄) celular y promueven la generación de O₂⁻ por la eNOS. Las ROS activan además a las PKC- α , PKC- β , y PKC- δ , lo que conduce a la disminución de la expresión de eNOS y el aumento de la expresión de ET-1, del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del TGF- β 1 en células endoteliales (Brownlee 2005).
- **AGEs:** Los AGEs son proteínas o lípidos que se glucosilan y oxidan tras el contacto con el monosacárido aldosa sin necesidad de ninguna enzima (Schmidt, Hori et al. 1994, Goldin, Beckman et al. 2006). El aumento de la formación de AGEs asociado a la hiperglucemia y al estrés oxidativo inhibe tanto las acciones vasculares como metabólicas de la insulina (Nishikawa, Edelstein et al. 2000). En humanos inhiben la fosforilación de la tirosina de IRS-1 e IRS-2 estimulada por insulina conduciendo a una inhibición de la activación de PI3K y Akt (Miele, Riboulet et al. 2003). En las células endoteliales, los AGEs disminuyen la biodisponibilidad de NO y la expresión de la eNOS acelerando la degradación del ARNm de la eNOS (Bucala, Tracey et al. 1991, Rojas, Romay et al. 2000) y aumentan la expresión de

ET-1 a través de la activación del NF- κ B (Quehenberger, Bierhaus et al. 2000). Por lo tanto, los AGEs alteran el equilibrio entre NO y ET-1 favoreciendo la vasoconstricción y la disfunción endotelial.

En los cardiomiocitos, el aumento de AGE, el estrés oxidativo y la activación de la PKC tienen efectos negativos sobre la función cardíaca, al prolongar los potenciales de acción, reducir la cinética de relajación y alterar la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos a través de cambios en la expresión y función de varios canales iónicos, receptores (receptor de rianodina, receptor β -adrenérgico) y bombas de iones (SERCA, bomba de sodio) (Davidoff 2006, Poornima, Parikh et al. 2006). Estas alteraciones tienen como consecuencia un endurecimiento ventricular y una disfunción diastólica, características frecuentemente observadas en modelos de diabetes en roedores y humanos.

3.4.1.2 Lipotoxicidad

Los estados de resistencia a la insulina se acompañan de niveles elevados de ácidos grasos libres o ácidos grasos no-esterificados (NEFAs) en la circulación sanguínea (Wan, Yang et al. 2009). La exposición de la vasculatura, el miocardio y el músculo esquelético a altos niveles de NEFAs inicia múltiples procesos celulares que incluyen, estrés oxidativo (Inoguchi, Li et al. 2000), alteraciones en el SRA local (Watanabe, Tagawa et al. 2005) y aumento de la sensibilidad adrenérgica en las CMLV (Stepniakowski, Goodfriend et al. 1995), lo que contribuye al desarrollo de la resistencia a insulina (Roden, Price et al. 1996, Wang, Zhang et al. 2006).

La infusión de NEFAs en humanos deteriora la captación de glucosa en respuesta a la insulina, así como la vasodilatación dependiente de NO (Steinberg and Baron 2002) a través de una disminución de la actividad de PI3K, PDK1, Akt y eNOS en respuesta a la insulina (Wang, Zhang et al. 2006).

Además la exposición a NEFAs aumenta los niveles celulares de diacilglicerol, ceramida, y grasa de cadena larga acil Coenzima A (acil-CoA). Estos metabolitos lipídicos activan las serin

quinasas tales como la PKC y la quinasa inhibidora κ B (IKK β), que regulan la activación del factor nuclear NF- κ B, un factor de transcripción asociado con la inflamación (Itani, Ruderman et al. 2002) que a su vez activa la producción de otras citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6 (Ajuwon and Spurlock 2005). El TNF- α activa la producción de IKK β y de JNK (quinasa c-Jun N-terminal), citoquinas inflamatorias que juegan un papel primordial en el desarrollo de la resistencia a insulina (Hirosumi, Tuncman et al. 2002). Igualmente, la activación de las isoformas PKC β 1 y - β 2 da como resultado una mayor fosforilación de la Ser³⁰⁷ del IRS-1 produciendo a una menor activación de Akt y eNOS tras la estimulación con insulina (Naruse, Rask-Madsen et al. 2006).

Por último en los cardiomiocitos el tratamiento con NEFA se asocia con una menor activación de PI3K/Akt, lo que resulta en una disminución de la captación de glucosa estimulada por insulina (Davidoff 2006), de la activación de la eNOS y de la función contráctil (Ouwens, Boer et al. 2005).

3.4.1.3 Inflamación

La resistencia a la insulina y la disfunción endotelial son estados patológicos que se caracterizan por un aumento de mediadores proinflamatorios (Fernández-Real and Ricart 2003). El tejido adiposo (y los macrófagos residentes infiltrados) secreta una gran cantidad de hormonas peptídicas que incluyen leptina, adiponectina, y citoquinas como el TNF- α , la IL-6, la resistina, el angiotensinógeno o el inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) que juegan un papel crucial en la homeostasis metabólica y vascular (Fernández-Real and Ricart 2003, Berg and Scherer 2005).

El TNF- α estimula, a su vez, la expresión de otras proteínas inflamatorias como la PRC o la IL-6. La PRC disminuye la producción de NO en respuesta a la insulina en células endoteliales a través de mecanismos que implican fosforilación de IRS-1 en Ser³⁰⁷ (Xu, Morita et al. 2007) y la disminución de la expresión de eNOS (Venugopal, Devaraj et al. 2002). Además, la PRC aumenta, simultáneamente, la producción de ET-1, la expresión del receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) (Wang, Li et al. 2003), la expresión de VCAM, E-Selectina y la proteína quimio-atrayente

monocítica-1 (MCP-1) en el endotelio vascular (Pasceri, Willerson et al. 2000) y, en consecuencia, el riesgo de ECV (Jialal, Devaraj et al. 2004).

3.5 Efectos del envejecimiento sobre la sensibilidad a la insulina

La tolerancia a la glucosa se reduce a menudo en los ancianos, y su disminución parece ser progresiva con la edad (Davidson 1979). Esto se debe a una pérdida en la capacidad de mantener la homeostasis de la glucosa debido, principalmente, a una disminución en la sensibilidad de los tejidos a la insulina, lo que promueve el desarrollo de diabetes *mellitus* tipo 2 (Reaven 2004). Por el contrario, la alta sensibilidad a la insulina está relacionada con la longevidad (Wijsman, Rozing et al. 2011).

La resistencia a la insulina asociada al envejecimiento puede deberse a múltiples factores entre los que se encuentran las modificaciones en la composición corporal, la disminución de la actividad física, cambios en otras hormonas como la hormona del crecimiento, factores de crecimiento similares a la insulina, esteroides sexuales o leptina, y la gluco- y lipotoxicidad producidas por las elevaciones mantenidas de los niveles circulantes de glucosa y NEFAs (Møller, Gormsen et al. 2003).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el envejecimiento cursa con resistencia a la insulina en tejidos insulino-dependientes como el tejido adiposo blanco (Escriva, Agote et al. 1997, Escrivá, Gavete et al. 2007, Serrano, Villar et al. 2009) o el músculo esquelético (De Solís, Fernández-Agulló et al. 2012), en cambio, la sensibilidad cardiovascular a la insulina en el envejecimiento ha sido mucho menos estudiada.

Como se ha mencionado previamente, en condiciones fisiológicas la insulina ejerce importantes acciones sobre el sistema cardiovascular (Muniyappa, Montagnani et al. 2007), induciendo un aumento de la contractilidad en el miocardio (Baron 1994, Brownsey, Boone et al. 1997, von Lewinski, Bruns et al. 2005, Zhang, Li et al. 2007), estimulando el reclutamiento capilar (Segal 2005) y ejerciendo un efecto vasodilatador directo en las arterias mediante la producción de NO en

el endotelio (Vincent, Barrett et al. 2003, Andreozzi, Laratta et al. 2007). La resistencia cardiovascular a la insulina en el envejecimiento se asocia, por tanto, con una disminución en la contractilidad cardíaca (Li, Xiong et al. 2009) debido, al menos en parte, a una disminución de la captación de glucosa por parte de los cardiomiocitos lo que, a largo plazo, induce fibrosis e hipertrofia cardíaca (Huggins, Domenighetti et al. 2008). Además, el envejecimiento cursa también con resistencia vascular a la insulina lo que, por un lado, aumenta la producción de ET-1 y la expresión de moléculas de adhesión del tipo VCAM en el endotelio y, por otro, disminuye la liberación de NO (Muniyappa, Montagnani et al. 2007), lo que contribuye a los procesos de rigidez vascular y disfunción endotelial (Figura 12).

Por estos motivos, las modificaciones en los niveles de insulina y/o en su respuesta en el envejecimiento podrían ser una de las causas de las alteraciones cardiovasculares asociadas a esta condición.

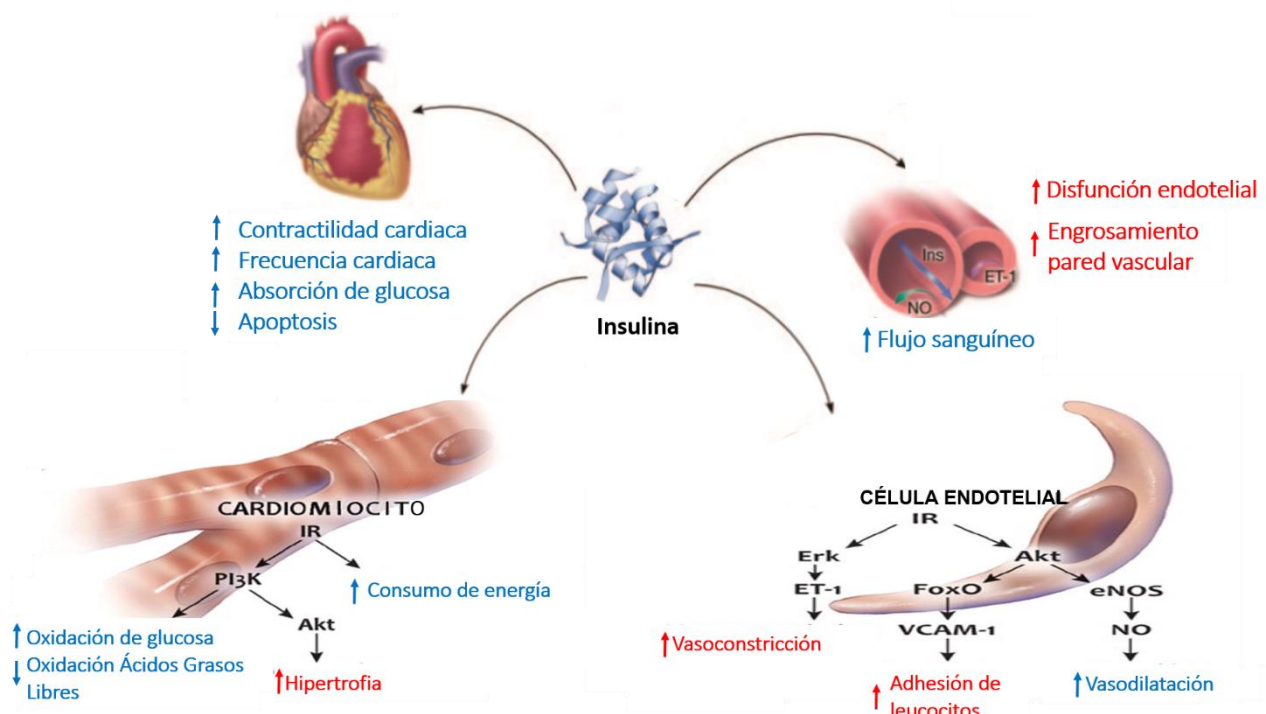


Figura 12. Acciones de la insulina en el sistema cardiovascular. Azul: Efectos de la insulina en condiciones fisiológicas; Rojo: Efectos de la insulina en situación de resistencia a la insulina. Imagen adaptada de (Muniyappa, Montagnani et al. 2007) y de (Rask-Madsen and Kahn 2012).

4. RESTRICCIÓN CALÓRICA Y ENVEJECIMIENTO

Dado que el envejecimiento no es una enfermedad el enfoque de este proceso fisiológico en términos de tratamiento no es adecuado. Por este motivo, se ha propuesto que en el envejecimiento el uso de estrategias preventivas como los hábitos de vida saludable son más beneficiosos que los tratamientos orientados a enfermedades (Rattan 2014).

La restricción calórica (RC) es, actualmente, una de las intervenciones más eficaces para retrasar la progresión del envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónicas relacionadas con la edad (Masoro 2000, López-Lluch and Navas 2016). La RC se define como una reducción en el consumo de energía a niveles normales-bajos, manteniendo la ingesta de proteínas y micronutrientes en niveles adecuados para evitar la desnutrición (Weiss and Fontana 2011).

Recientemente se han publicado los resultados derivados de estudios de 20 años de duración que demuestran que las enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo la diabetes, las ECV y el cáncer, son retrasadas o prevenidas por la RC (Colman, Anderson et al. 2009).

El efecto de la RC sobre la longevidad se postuló en la teoría del envejecimiento propuesta por David Sinclair (Sinclair 2005), que describió que la RC no es un efecto simple y pasivo sino una respuesta de estrés activa y altamente conservada que aumenta la probabilidad de que el organismo sobreviva a la adversidad mediante mecanismos de reparación y modulación del metabolismo. Esta teoría ha sido reforzada por la hipótesis de "Hormesis de la RC", que sugiere que la inducción de un estrés leve provoca respuestas adaptativas en las células y los órganos, que previenen, al menos en parte, los daños inducidos por un estrés mayor (Hipkiss 2007, Martins, Galluzzi et al. 2011, Stankovic, Mladenovic et al. 2013).

Diversos estudios han demostrado que la RC prolonga la vida (Fontana, Meyer et al. 2004), a través de una disminución en la inflamación (Guo, Mitchell-Raymundo et al. 2002) y el estrés oxidativo (Sohal and Weindruch 1996), tal y como reflejan las concentraciones disminuidas de diferentes citoquinas proinflamatorias y la disminución en la producción de O_2^- , tanto en animales

de experimentación como en seres humanos (Fernández-Galaz, Fernández-Agulló et al. 2002, Ungvari, Parrado-Fernandez et al. 2008). Por lo tanto, las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la RC hacen que esta intervención nutricional sea una alternativa interesante y prometedora para prevenir y controlar algunas de las enfermedades asociadas a la edad.

Además, estudios realizados en macacos *Rhesus* (Anderson and Weindruch 2012), han demostrado que la reducción del peso y la adiposidad inducidas por la RC se asocian con una mejora de la sensibilidad a la insulina (Kemnitz, Roecker et al. 1994, Colman, Ramsey et al. 1999) debido a una disminución en los niveles de PRC, triglicéridos y colesterol LDL, lo que se traduce en una mejora en el perfil cardiovascular (Edwards, Rudel et al. 1998). Por último, se ha demostrado también que la RC atenúa la pérdida de masa muscular asociada a la edad (sarcopenia) (McKiernan, Colman et al. 2011).

4.1 Restricción calórica y resistencia a la insulina

El aumento de la adiposidad asociado con el envejecimiento es una de las principales causas asociadas al desarrollo de la resistencia a la insulina ya que la reducción de la adiposidad mediante RC mejora la resistencia a la insulina y la inflamación asociadas a la edad (Gabriely, Ma et al. 2002, Escrivá, Gavete et al. 2007, Horrillo, Sierra et al. 2011).

La RC mejora algunos de los parámetros del síndrome metabólico (Verdery and Walford 1998, Walford, Mock et al. 2002) como la presión arterial, los triglicéridos circulantes, el colesterol LDL, la glucosa, la insulina y los niveles de varios marcadores inflamatorios tanto en modelos animales como en seres humanos (Delahanty and Nathan 2008, Takahashi, Masuda et al. 2011). Además, a largo plazo la RC conduce a una mejora de la homeostasis de la glucosa en los seres humanos (Volek, Fernandez et al. 2008) y en las ratas (Masoro, McCarter et al. 1992), lo que resulta en la disminución de la glucemia y la hiperinsulinemia. Este efecto parece estar relacionado, al menos en parte, con los niveles de la hormona adiponectina.

La adiponectina es una hormona con efectos antidiabéticos y antiaterogénicos que se sintetiza exclusivamente en el tejido adiposo y que actúa sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Akingbemi 2013, Koch, Lowe et al. 2014). En situaciones de resistencia a la insulina, se ha observado una baja concentración sérica de adiponectina (Chandran, Phillips et al. 2003), mientras que tras la RC los niveles séricos de esta hormona aumentan (Combs, Berg et al. 2003), lo que se asocia con una mejora en el perfil glucémico y lipídico (Tschrirter, Fritsche et al. 2003).

La mejora en la sensibilidad a la insulina en respuesta a la RC está mediada por un aumento tanto de la expresión génica de GLUT-4 como de su translocación a la membrana plasmática en el tejido adiposo (Zanquetta, Seraphim et al. 2003, Park, Choi et al. 2005). Sin embargo, este efecto no se observa en el músculo esquelético (Park, Choi et al. 2005) donde el mecanismo por el cual se produce la mejora de la sensibilidad a la insulina (Sequea, Sharma et al. 2012) hoy en día es objetivo de estudio, aunque está relacionado con un aumento en la fosforilación mediada por insulina en los principales sitios reguladores de Akt (McCurdy and Cartee 2005).

4.2 Efectos de la restricción calórica en el sistema cardiovascular

Como se ha mencionado anteriormente, el envejecimiento cursa con alteraciones cardiovasculares tanto a nivel cardíaco como a nivel vascular. Sin embargo, algunos individuos alcanzan una edad avanzada sin padecer ninguna de estas alteraciones, mientras que otros presentan estas manifestaciones a una edad muy temprana (Coppedè 2012, Niccoli and Partridge 2012). Por este motivo, se ha postulado que los individuos que están libres de estos síntomas en la vejez es probable que hayan estado expuestos a menos factores de riesgo genéticos y ambientales que aquellos que sí los presentan (Niccoli and Partridge 2012).

Durante muchos años, se han investigado los factores de riesgo ambiental de las ECV asociadas al envejecimiento y se han identificado como factores protectores estilos de vida saludables tales como una alimentación adecuada y la práctica de ejercicio físico (Haveman-Nies, de Groot et al. 2003, Allen and Morelli 2011).

La RC tiene efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular (Dolinsky and Dyck 2011) entre los que se encuentra un aumento de la resistencia al estrés oxidativo (Rippe, Lesniewski et al. 2010), la reducción de la producción de ROS por las mitocondrias cardíacas (Gredilla, Sanz et al. 2001), la reducción de la inflamación (Castello, Froio et al. 2010) y la prevención de la apoptosis de los cardiomiocitos (Lee, Allison et al. 2002). La reducción del estrés oxidativo y el aumento de la actividad y/o la expresión de la eNOS, así como de la biodisponibilidad del NO, desempeñan un papel importante en la disminución de la presión arterial inducida por la RC (Sharifi, Mohseni et al. 2008). Como se ha mencionado anteriormente, el NO no sólo regula el tono vascular mediando la vasodilatación dependiente del endotelio, sino que también posee propiedades antioxidantes, antiproliferativas y antiinflamatorias (Chatterjee, Black et al. 2008). Además, el NO inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de células inflamatorias al endotelio y la proliferación de CMLV, por lo que podría desempeñar un papel importante en la inhibición del proceso aterosclerótico y en la preservación de la función endotelial en respuesta a la RC.

En este sentido, la RC resulta una estrategia útil para disminuir los niveles de presión arterial, colesterol LDL, glucosa e insulina, y aumentar los de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) tanto en modelos animales (Gresl, Colman et al. 2001, Shinmura, Tamaki et al. 2005) como en los seres humanos (Walford, Harris et al. 1992, Fontana, Meyer et al. 2004).

Además de sus efectos beneficiosos en la reducción del riesgo cardiovascular, la RC a corto plazo (30-40% de restricción durante 4-5 semanas) mejora la recuperación de la función cardíaca post-isquémica tanto en animales jóvenes (Shinmura, Tamaki et al. 2007, Sung, Soltys et al. 2011) como de avanzada edad (Shinmura, Tamaki et al. 2005) y aumenta las tasas de oxidación de la glucosa en el miocardio aumentando los niveles de ATP al final de la reperusión, lo que contribuye a la recuperación post-isquémica de la función cardíaca (Sung, Soltys et al. 2011).

Asimismo, la RC previene las alteraciones en el remodelado estructural del corazón, la fibrosis cardíaca, y el aumento de la rigidez del ventrículo izquierdo asociados al envejecimiento ya que

disminuye los depósitos de colágeno, el contenido de la MEC y la apoptosis de los cardiomiocitos inducidos por el envejecimiento (Kemi, Keenan et al. 2000).

Sobre la vasculatura, además del aumento de la biodisponibilidad del NO, la RC también afecta a los niveles de hormonas y moléculas vasoactivas como la insulina y la ET-1 entre otras, ya que se ha descrito que tanto las concentraciones plasmáticas de ET-1 como de insulina disminuyen con la pérdida de peso (Masoro 2000, Miyaki, Maeda et al. 2009, Lopes, Leite et al. 2016).

4.3 Modelos experimentales de restricción calórica

En 1935, el investigador McCay demostró que las ratas sometidas a RC tenían una esperanza de vida un 33% superior al grupo control con alimentación *ad libitum*. Además, estas ratas presentaban un aspecto más saludable y juvenil, por lo que a simple vista parecían más sanas (McCay, Crowell et al. 1935). Estudios posteriores confirmaron que el aumento de la esperanza de vida tras la RC ocurre en ambos géneros en muchas cepas de ratas, ratones, hámsters, así como en especies no mamíferas tales como levaduras, gusanos, arañas, moscas y peces (Masoro 2000). Hasta el momento, se ha demostrado que la RC es la única aproximación que enlentece el proceso de envejecimiento en numerosas especies animales, por lo que ha sido y sigue siendo un importante área de investigación en gerontología biológica.

Existen diversos protocolos de RC en animales de experimentación, en los que se puede modificar tanto la durabilidad en el tiempo (crónica o esporádica) como el porcentaje de RC (severa, moderada y leve) (Vitousek, Gray et al. 2004).

En gran parte de las investigaciones en roedores, los animales se someten a una RC del 40-50% de las calorías que comerían si tuvieran disponible un suministro ilimitado. Aunque los beneficios de la RC son inversamente proporcionales a la cantidad consumida, existe un límite de RC, siendo éste del 70% en el caso de los ratones, habiéndose demostrado que los animales suministrados con una cantidad de comida inferior mueren a edades más tempranas que los animales alimentados *ad libitum* (Vitousek, Gray et al. 2004).

Otro tipo de RC es el ayuno intermitente, que consiste en ayunar a los animales en horarios alternos (días o franjas horarias), de modo que cuando estos animales tienen a su disposición la comida no logran comer lo suficiente para compensar el ayuno, disminuyendo su peso corporal en un 30-40% respecto a los controles (Anson, Guo et al. 2003).

Uno de los protocolos de RC moderados que tiene efectos sobre las acciones de la insulina en los tejidos insulino-dependientes es una RC del 20% durante los 3 últimos meses de vida. Esta RC disminuye la adiposidad y mejora la sensibilidad a la insulina tanto a nivel central (García-San Frutos, Fernández-Agulló et al. 2007) como a nivel periférico, en el tejido adiposo (Escrivá, Gavete et al. 2007) y muscular (De Solís, Fernández-Agulló et al. 2012). Además este protocolo de RC disminuye algunos marcadores inflamatorios como el TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12 β en el tejido adiposo, hipotálamo e hígado (Horrillo, Sierra et al. 2011).

Aunque la RC engloba un gran abanico de efectos beneficiosos que permiten retrasar algunas de las alteraciones asociadas al envejecimiento (Masoro 2000, Dolinsky and Dyck 2011, López-Lluch and Navas 2016), hasta el momento, no existe ningún estudio en el que se haya valorado el posible efecto beneficios de la RC sobre la respuesta del corazón y de los vasos sanguíneos en respuesta a la ET-1 y la insulina en el envejecimiento.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis del estudio

En base a los antecedentes anteriormente expuestos nos planteamos la hipótesis de que el envejecimiento podría cursar con alteraciones en la respuesta del corazón y de los vasos al péptido vasoconstrictor ET-1 y con una disminución en la sensibilidad cardiovascular a la insulina pudiendo ambos hechos contribuir al deterioro de la función cardiovascular asociado a la vejez. Asimismo, un protocolo de RC moderada podría prevenir, al menos en parte, los cambios en la respuesta cardiovascular a la ET-1 y la insulina inducidos por el envejecimiento.

Objetivo general

Estudiar los efectos del envejecimiento y de la RC en la respuesta del corazón y los vasos a la ET-1 y a la insulina.

Objetivos específicos

1. Estudiar la respuesta del miocardio y las arterias coronarias y renales a la ET-1 en ratas de 3 meses (3m) y 24 meses de edad (24m) alimentadas *ad libitum* y de 24 meses de edad sometidas a RC (24m-RC).
2. Analizar la expresión de ET-1 y sus receptores (ET_A y ET_B) y de marcadores inflamatorios y profibróticos en tejido arterial y cardíaco procedente de las ratas de 3m, 24m y 24m-RC
3. Estudiar la respuesta del miocardio, las arterias coronarias y la aorta a la insulina en ratas de 3m, 24m y 24m-RC.
4. Analizar la expresión y activación de proteínas implicadas en las vías de señalización intracelular de la insulina en tejido cardíaco, arterial y en cultivos primarios de células endoteliales de aorta en ratas de 3m, 24m y 24m-RC.
5. Estudiar el papel del PVAT en la respuesta vascular a la insulina en ratas de 3m, 24m y 24m-RC

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado ratas *Wistar* de 3 y 24 meses sometidas o no a RC. La manipulación de animales se realizó de acuerdo a las normas de la Comunidad de Madrid y de la Unión Europea (Real Decreto 53/2013).

Las ratas se estabularon en jaulas individuales en una habitación con condiciones controladas de humedad (50-60%) y temperatura (22 – 24 °C) bajo un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Se utilizó un total de 94 animales divididos en tres grupos experimentales:

- Ratitas jóvenes de 3 meses de edad alimentadas *ad libitum* (3m, n = 35)
- Ratitas de 24 meses de edad alimentadas *ad libitum* (24m, n = 31)
- Ratitas de 24 meses de edad sometidas a un 20% de restricción calórica durante los 3 últimos meses de vida (24m-RC, n = 28).

Para calcular la cantidad de comida que debían ingerir los animales del grupo 24m-RC, a partir del mes 21 de vida se determinó la ingesta diaria de los animales durante una semana y a continuación se les suministró una cantidad de pienso equivalente al 80% de ese valor durante un período de 3 meses. Como la ingesta normal resultó ser de 20g/animal/día, a las ratas del grupo 24m-RC se les suministró 16 g de pienso diarios entre los meses 21 y 24 de vida.

Se realizó un control semanal de la ganancia de peso corporal de los animales de los tres grupos experimentales desde el destete hasta el momento del sacrificio.

2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En el presente estudio se han analizado muestras de corazón, arteria renal, aorta, tejido adiposo perivascular aortico (PVAT), y células endoteliales aórticas de ratas pertenecientes a los tres grupos experimentales.

Tras el sacrificio de los animales por decapitación, previa anestesia con Pentobarbital sódico (100 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), se extrajeron los órganos y tejidos anteriormente citados y se pesó el tejido adiposo subcutáneo lumbar, el tejido adiposo visceral peri-

epidimal, el músculo gastrocnemio y el corazón. Además, se recogió la sangre troncular a partir de la cual se separó el suero mediante centrifugación (3000 r.p.m, 20 minutos) en el que se midieron posteriormente los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y colesterol.

3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE GLUCOSA, INSULINA, NEFAs, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL TOTAL

Los niveles séricos de glucosa se determinaron mediante el método de glucosa oxidasa (kit Amplex Red Glucose/Glucose Oxidasa Assay, Molecular Probes, EE.UU). La insulina sérica se determinó mediante radioinmunoensayo utilizando un kit comercial (Linco Research, St. Charles, MO, EE.UU). Los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) séricos se midieron mediante un kit enzimático (Wako Chemicals, Neuss, Alemania). Por último, la determinación de los niveles séricos de triglicéridos se realizó con un kit enzimático (ITC Diagnostics, Izasa, España) y el colesterol total de la sangre se midió usando el Accutrend (GC Glucosa y Colesterol Analyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania)).

4. TÉCNICA DEL CORAZÓN PERFUNDIDO (Langendorff)

Tras sacrificar los animales se extrajo el corazón, se canuló rápidamente la aorta y se perfundió retrógradamente la circulación coronaria con solución fisiológica de Krebs-Henseleit a pH 7.4 (115 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ y 11 mM glucosa) a un flujo constante entre 12-17 ml/min mediante una bomba peristáltica (Gilson, Middleton, WI, EE.UU). El corazón se mantuvo en una cámara a 37 °C de temperatura durante todo el experimento y la solución de perfusión se gaseó continuamente con una mezcla gaseosa compuesta por 95% de O₂ y 5% CO₂. Tras 30 minutos de equilibrado, se estudió la respuesta del miocardio a la ET-1 (10⁻¹³ - 10⁻⁷ M) (Bachem, Bubendorf, Suiza) inyectada en la cánula de

perfusión, o a la insulina (10^{-9} - 10^{-7} M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) disuelta en la solución fisiológica de Krebs.

La presión de perfusión de las coronarias se registró mediante un transductor (Statham Instruments, Los Ángeles, CA, EE.UU) conectado proximalmente a la cánula y la presión intraventricular se registró mediante un globo de látex insertado en el ventrículo izquierdo y conectado a otro transductor (Statham Instruments, Los Ángeles, CA, EE.UU). La presión de perfusión coronaria y la presión intraventricular se registraron en un ordenador usando el software Chart 5 v5.4.1 y el sistema de adquisición de datos PowerLab/8SP (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EE.UU). La presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (presión sistólica - presión diastólica), la primera derivada de la presión intraventricular respecto al tiempo establecido como un indicador de la contractilidad del miocardio (dP/dt), y la frecuencia cardiaca se calcularon a partir del registro de la presión intraventricular.

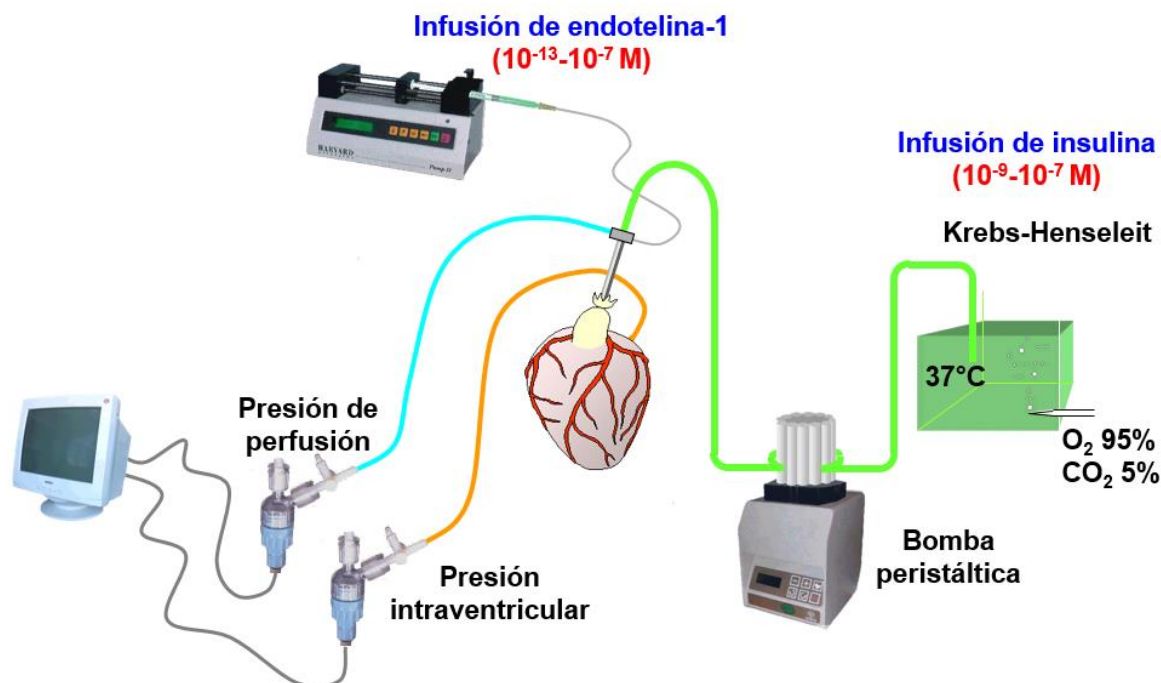


Figura 13. Representación esquemática del montaje experimental utilizado para medir la presión de perfusión coronaria, la contractilidad y la frecuencia cardiaca en el corazón perfundido de rata.

El efecto vasoconstrictor de la ET-1 y el efecto vasodilatador de la insulina en la circulación coronaria, así como sus efectos sobre la contractilidad del miocardio y la frecuencia cardíaca, se registraron como cambios respecto a los niveles basales de presión de perfusión, presión intraventricular, dP/dt y frecuencia cardíaca. En los experimentos con insulina algunos corazones ($n = 6$) fueron preincubados con Wortmanina 10^{-6} M (APExBIO, Houston, TX, EEUU) (inhibidor de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)) 30 minutos antes de comenzar la curva de insulina.

5. EXPERIMENTOS DE REACTIVIDAD VASCULAR EN ARTERIAS RENALES Y AORTA

Tras el sacrificio se disecaron las arterias renales y aorta procedentes de los animales de los 3 grupos experimentales y se cortaron en segmentos de 2 mm. Cada segmento se introdujo en un baño de órganos de 4 ml con una solución fisiológica de Krebs-Henseleit a 37°C con un pH 7.4 (115 mM NaCl; 4.6 mM KCl; 1.2 mM KH_2PO_4 ; 1.2 mM MgSO_4 ; 2.5 mM CaCl_2 ; 25 mM NaHCO_3 y 11 mM glucosa) y se gaseó continuamente con una mezcla gaseosa compuesta por 95% de O_2 y 5% de CO_2 para registrar su tensión isométrica. Para el montaje se pasaron dos alambres de acero finos (100 μm de diámetro) a través del lumen de cada segmento vascular. Uno de los alambres se fijó a la pared del baño de órganos y el otro alambre se conectó a un transductor de tensión (Universal Transducing Cell UC3 and Statham Microscale Accessory UL5, Statham Instruments, Inc.). Tras una aplicación de tensión pasiva óptima de 1 g, los segmentos vasculares se dejaron equilibrar durante 60-90 minutos. Posteriormente los segmentos fueron estimulados con cloruro potásico (KCl 100 mM) para determinar la contractilidad del músculo liso. Los segmentos que no aumentaron la tensión isométrica en al menos 0.5 g en respuesta al KCl fueron descartados.

Los cambios en la tensión isométrica se registraron usando un sistema de adquisición de datos PowerLab (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EE.UU).

5.1 Reactividad vascular en respuesta a la ET-1

Tras el equilibrado de los segmentos de arterias renales se realizó una curva dosis-respuesta a la ET-1 ($10^{-10.5}$ – $10^{-6.5}$ M). Para estudiar el mecanismo de contracción en respuesta a la ET-1, algunos segmentos se preincubaron con el antagonista del receptor de endotelina ET_A, BQ-123 (10^{-7} M) (cyclo-Asp-Pro-Val-Leu-Trp) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), con el del antagonista del receptor de endotelina ET_B, BQ-788 (10^{-7} M) (2,6-Dimethylpiperidinecarbonyl- γ -Methyl-Leu-Nin-(Methoxycarbonyl)-D-Trp-D-Nle,N-[N-[N-[(2,6-Dimethyl-1-piperidiny)carbonyl]-4-methyl-L-leucyl]-1-(methoxycarbonyl)-D-tryptophyl]-D-norleucine sodium salt) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) o con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME (10^{-4} M) (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

La contracción en respuesta a la ET-1 se expresó como el porcentaje de la contracción producida por el KCl 100mM. Asimismo, se calculó el logaritmo de la concentración que produce el 50% del efecto máximo (LogCE₅₀) a partir de una interpolación geométrica.

5.2 Reactividad vascular en respuesta a la insulina

Tras el equilibrado de los segmentos de aorta se realizó una curva dosis-respuesta a la insulina (10^{-8} – $10^{-5.5}$ M). Antes de comenzar la curva de insulina los segmentos se precontrajeron con Fenilefrina $10^{-7.5}$ M y la relajación en respuesta a la insulina se determinó en base al porcentaje del tono final alcanzado mediante la relajación al donador de NO nitroprusiato sódico (10^{-5} M). Para estudiar el mecanismo de relajación a la insulina algunos segmentos se preincubaron durante 20 minutos con L-NAME (10^{-4} M) y para estudiar el mecanismo de contracción a dosis altas de insulina otros segmentos de aorta se preincubaron durante 20 minutos con el antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁), Losartan (10^{-5} M) (2-Butyl-4-chloro-1-[2'-(1H-tetrazol-5-yl)(1,1'-biphenyl)-4-yl]methyl-1H-imidazole-5-methanol monopotassium salt) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), el antagonista del receptor de endotelina ET_A, BQ-123 (10^{-6} M) (cyclo-Asp-Pro-Val-Leu-Trp) y el antagonista de la tromboxano sintasa, Furegrelato (10^{-6} M) (5-(3-

pyridinylmethyl)-2-benzofurancarboxylic acid, sodium salt) (cayman chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU).

Además, para estudiar el efecto del PVAT sobre la respuesta vascular a la insulina, se disecaron y cortaron segmentos de aorta torácica de 2 mm recubiertos con PVAT de los tres grupos experimentales y se montaron en el baño de órganos. En estos segmentos se estudió la respuesta vasodilatadora en respuesta a la insulina en ausencia o en presencia de L-NAME (10^{-4} M). Para ello, antes de comenzar la curva de insulina los segmentos se precontrajeron con Fenilefrina $10^{-7.5}$ M. La relajación en respuesta a la insulina se determinó en base al porcentaje del tono final alcanzado mediante la relajación al donador de NO nitroprusiato sódico (10^{-5} M).

6. INCUBACIÓN DE SEGMENTOS ARTERIALES EN PRESENCIA O AUSENCIA DE INSULINA Y DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se utilizaron segmentos de 2 mm de aorta recubierta o no con PVAT. Estos segmentos se incubaron durante 30 minutos a 37°C con medio de cultivo DMEN/F-12 + 1% de antibiotico (vehículo), o insulina 10^{-7} M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). Tras la incubación, se descartó el PVAT que recubría algunos de los segmentos y los segmentos de aorta limpios se guardaron a -80 °C.

La concentración de nitritos y nitratos ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) en el medio de cultivo se midió mediante un método modificado del ensayo de Griess, descrito por Miranda et al., (Miranda, Espey et al. 2001). Brevemente, en una placa de 96 pocillos se añadieron 100 μl de cloruro de vanadio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a 100 μl de muestra o patrón. Inmediatamente después, se añadió a cada pocillo el reactivo de Griess (mezcla 1:1 de 1 % de sulfanilamida (Merck, Darmstadt, Alemania) y 0,1 % de naftiletilendiamina diclorhidrato (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La absorbancia se midió a 540 nm y la concentración de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ se calculó utilizando una curva standard de NaNO_2 expresada en μM .

7. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE AORTA

Tras el sacrificio de los animales, se disecó la aorta, se limpió con solución salina tamponada con fosfato (PBS) esteril y se cortó transversalmente. Posteriormente, se introdujo en un *flask* con 0.2% de colagenasa disuelta en PBS esteril, previamente filtrada mediante un filtro de 0.2 μm . A continuación, se incubó durante 15 minutos a 37 °C y 180 r.p.m en un agitador orbital (Controltecnica, Boadilla del Monte, Madrid, España). Tras la incubación, se paró la reacción añadiendo al *flask* 5 ml de DMEM/F-12 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) suplementado con 10% SFB (suero bovino fetal) (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU) y 1% antibiotico (estreptomicina-penicilina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU)) atemperado y se descartó la aorta. El medio de cultivo se centrifugó 5 minutos a 1000 r.p.m, se desechó el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo atemperado. Las células se sembraron en un *flask* de 25 cm^3 y a los 45 minutos se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco. Para el adecuado crecimiento de las células el *flask* se mantuvo en un incubador (Esco, Hatboro, PA, EE.UU) a 37 °C, 95% O_2 y 5% CO_2 y se cambió el medio en días alternos.

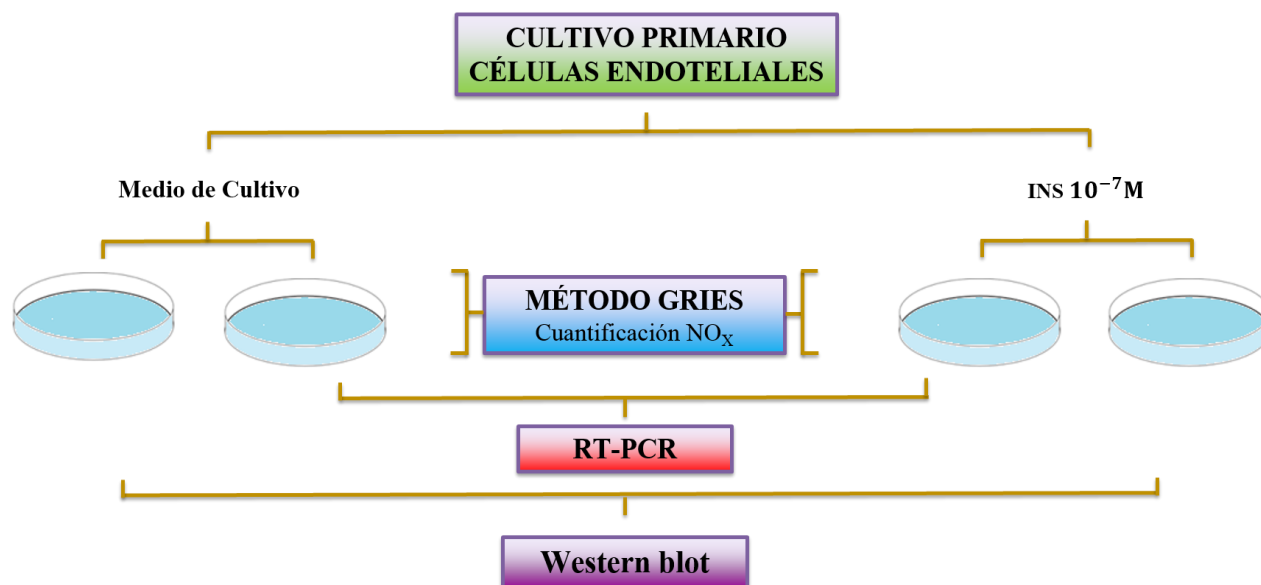
7.1 Crecimiento y proliferación del cultivo

Una vez alcanzada una confluencia del 80-90%, las células se lavaron con PBS y, posteriormente, se realizó una tripsinización mediante la adición de 2.5ml de tripsina (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU) al *flask*. Tras una incubación a 37 °C durante 1 minuto la reacción se paró añadiendo 2,5 ml de DMEM + SFB 10% y se centrifugó a 1000 r.p.m durante 5 min. Por último, el *pellet* de células se resuspendió en 5 ml de medio y se sembró en un *flask* de 75 cm^3 al que se le habían añadido previamente 5 ml de DMEM + SFB 10% + antibiotico 1%. Posteriormente, las células se dejaron crecer hasta confluencia, momento en el que se realizó la segunda tripsinización del mismo modo que anteriormente. Las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo a los que se añadieron 25 ml de DMEM + SFB 10% + antibiotico 1%, de los

cuales 25 ml se utilizaron para la siembra de los experimentos y los 5 ml restantes se sembraron en un *flask* de 75 cm³ para mantener la línea celular.

7.2 Siembra del experimento

Por cada aorta de cada animal se sembraron cuatro placas petri P100 con 5 ml de células/placa. Las células se dejaron crecer hasta una confluencia del 80-90%, momento en el que se sometieron a un ayuno de 18 horas (medio de cultivo sin SFB al 10%). Posteriormente, las células se incubaron con 5 ml de DMEM + antibiotico 1% suplementado o no con insulina 10⁻⁷ M durante 30 minutos (Esquema 1). A continuación se recogió el medio de cultivo en el que posteriormente se midió la concentración de NO₂ + NO₃ mediante el método modificado de Griess. A continuación, a dos de las placas petri se les añadió 1 ml de trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU), se les rascó la base con un rascador (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU) para lisar las células y el volumen se congeló a -80 °C para la posterior extracción del ácido ribonucleico (ARN). En las dos placas restantes, se añadieron 200 µl de buffer de lisis proteica (6.7 ml buffer RIPA (0.8% fosfato monosódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU); 4.2% fosfato disódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU); 5% Tritón X-100 al 20% (Panreac, Barcelona, España); 0.5% azida sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) y 2,5% NaCl 4M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU)), 35 mg deoxicolato sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), 70 µl PMSF 1.74% (p/v) (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) y 1 pastilla de un cocktail de inhibidor de proteasas (Roche, Basilea, Suiza)), se rascaron y, de nuevo, se congeló a -80 °C el volumen obtenido para realizar una extracción proteica.



Esquema 1. Experimentos realizados en células endoteliales de aorta de rata.

8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN TEJIDO ARTERIAL Y CARDÍACO

8.1 Extracción de proteínas

Se homogeneizaron 100 mg de tejido arterial o cardíaco en 500 µl de buffer de lisis y los homogenizados se congelaron toda la noche a -80 °C. Al día siguiente, tanto los homogenizados de las células endoteliales como los del tejido arterial y cardíaco, se centrifugaron a 4 °C, 14.000 r.p.m durante 20 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el *pellet* y se determinó la concentración de proteínas totales en el sobrenadante utilizando el método Bradford (Bradford 1976).

8.2 Western Blot

En cada ensayo, para cada una de las muestras se preparó una mezcla que contenía 100 µg de proteína y 95% de Laemli Sample Buffer (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU) con 5% de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), proporción 1:1. Las muestras se llevaron a ebullición (100 °C) y se cargaron en los pocillos de los geles de resolución SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), con diferentes cantidades de acrilamida (8-12%) en función del peso molecular de la proteína a estudiar. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinidileno (PVDF) (Bio-Rad, Hércules, CA,

EE.UU) que posteriormente se tiñó con rojo *Ponceau* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) para confirmar la correcta transferencia proteica desde el gel de acrilamida a la membrana de PVDF. Posteriormente, las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en polvo (Nestlé, Vevey, Suiza) disuelta en TTBS (0.1% Tween 20 Tris-Buffer Saline) durante 1h y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en la solución de bloqueo que, en el caso de las proteínas fosforiladas, fue 5% BSA (albúmina bovina sérica). Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS (3 lavados de 15 minutos) y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, EE.UU) diluido 1:2.000 en la solución de bloqueo. La actividad de la peroxidasa se visualizó mediante un sistema ChemiDoc XRS de Imagen Molecular (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU) por quimioluminiscencia utilizando Luminata TM Forte (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se cuantificó por densitometría utilizando el software informático ImageJ. Finalmente, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario frente a α -tubulina para normalizar cada muestra en función de la carga.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en la Inmunotransferencia.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución
eNOS	BD Bioscience, San José, CA, EE.UU	1:1000
p-eNOS	Merck Millipore, Darmstadt, Alemania	1:500
Akt	Merck Millipore, Darmstadt, Alemania	1:1000
p-Akt	Cell signaling Technology	1:500
MAPK	Merck Millipore, Darmstadt, Alemania	1:1000
p-MAPK	Merck Millipore, Darmstadt, Alemania	1:500
Receptor ET _A	Alomone labs Ltd, Jerusalem, Israel	1:280
Receptor ET _B	Alomone labs Ltd, Jerusalem, Israe	1:280
α -tubulina	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU	1:1000

9. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR A TIEMPO REAL

9.1 Extracción de ARN

En las muestras de corazón, arterias (renales y aorta) y células endoteliales se extrajo el ARN por el método de Chomczynski (Chomczynski 1993). Para ello, 100 mg de tejido, se homogeneizaron junto con 1 ml de Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) con un homogeneizador automático (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EE.UU). A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo (MERCK, Whitehouse Station, NJ, EE.UU) al lisado y se agitó durante 15 segundos. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente las muestras se centrifugaron a 4 °C y 12.500 r.p.m durante 15 minutos. Después, se retiró la fase acuosa (sobrenadante), a la cual se añadieron 500 µl de isopropanol (MERCK, Whitehouse Station, NJ, EE.UU). Tras una incubación de 10 minutos en hielo, se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones que la anterior para precipitar el ARN. Seguidamente, se decantó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol 70% y se realizó una tercera centrifugación en las mismas condiciones anteriores (5 minutos) para lavar el *pellet*. Tras la centrifugación, se decantó nuevamente el sobrenadante y se eliminó el etanol con ayuda de una micropipeta. Por último, el precipitado de ARN se resuspendió en H₂O estéril libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU). Para cuantificar la concentración y estimar la pureza del ARN total obtenido se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU).

9.2 Reacción de Retrotranscripción (RT)

El ARN total (1-2µg) diluido en 25 µl H₂O estéril procedente de cada muestra de aorta, arteria renal, corazón y PVAT se retrotranscribió a ADN monocatenario (ADNc) mediante la reacción de transcripción inversa. Esta reacción se llevó a cabo mediante un *kit* comercial (High Capacity, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) que contiene los nucleótidos (25x dNTPs Mix), el tampón (10x RT Buffer), los cebadores (10x RT Primers) y la enzima transcriptasa inversa (MultiScribe® Reverse Transcriptase). Se preparó una mezcla de estos reactivos siguiendo las instrucciones del

fabricante y posteriormente se añadieron 25 µl de dicha mezcla al ARN. A continuación, las muestras se introdujeron en un termociclador (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU) programado para realizar tres pasos; 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C y 5 minutos a 85 °C. Al terminar, se añadieron 50 µl de H₂O estéril a cada muestra y éstas se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

9.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-PCR)

Para llevar a cabo la amplificación cuantitativa de los ADNcs que se han generado en la retrotranscripción, se utilizó el aparato *Step One* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Tras realizar una prueba para determinar la dilución del ADNc a la cual se produce una amplificación óptima (rangos: $20 < Ct < 30$), se realizó la amplificación de cada uno de los genes en placas de 48 pocillos (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU). A cada pocillo se le añadió: 1 µl de ADNc de cada muestra problema, 5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix No Amperase 2X (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU), 3.5 µl de H₂O esteril (Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU) y 0.5 µl de la sonda Taqman específica para cada gen (Tabla 2) 20X TaqMan Gene Expression Assay Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU).

Todos los resultados se normalizaron mediante los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva 18S. La cuantificación relativa se calculó utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001).

Tabla 2. Referencias de los *primers* y las sondas TaqMan adquiridas de la casa comercial Life Technologies. Amarillo (ET-1 y sus receptores), azul (marcadores inflamatorios y profibróticos), naranja (óxido nítrico sintasas), verde (transportador de glucosa tipo 4 y receptor de insulina) y morado (gen constitutivo).

Gen	Referencia
ET-1	Rn 00561129
ET_A	Rn 00561137
ET_B	Rn 00569139
TGF-β1	Rn 00572010
COX-2	Rn 01483828
TNF-α	Rn 01525859
IL-6	Rn 01489669
IL-1β	Rn 00580432
iNOS	Rn 00561646
eNOS	Rn 02132634
nNOS	Rn 00583793
GLUT-4	Rn 00562597
IR	Rn 00690703
18S	Rn 01428915

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se representaron mediante la media \pm el error estándar de la media (S.E.M) y se consideraron significativos cuando $P < 0.05$. El estudio estadístico se realizó mediante el programa informático GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad, La Jolla, CA, EE.UU).

Para evaluar los efectos de la edad se realizó una *t-Student* de dos colas para datos independientes comparando las ratas de 3m con las de 24m. Igualmente, los efectos de la RC se analizaron mediante *t-Student* comparando las ratas de 24m con las de 24m-RC. Por último, la expresión génica y proteica en respuesta o no a la insulina se analizó mediante una *t-Student* de dos colas para datos independientes comparando el estado basal frente al estimulado con insulina.

RESULTADOS

1. PARÁMETROS GENERALES

1.1. Composición corporal

Los efectos de la edad y la RC sobre el peso corporal y sobre el peso de la grasa visceral y subcutánea, el gastrocnemio y el corazón se muestran en la Tabla 3. La edad incrementó significativamente tanto el peso corporal ($P<0.001$), como el peso del tejido adiposo visceral ($P<0.001$) y subcutáneo ($P<0.001$) de los animales y disminuyó el peso del gastrocnemio ($P<0.001$) y del corazón ($P<0.001$) respecto a las ratas de 3m. La RC disminuyó significativamente tanto el peso corporal ($P<0.001$), como del tejido adiposo visceral ($P<0.001$) y subcutáneo ($P<0.01$), y aumentó significativamente el peso del gastrocnemio ($P<0.05$) y del corazón ($P<0.001$) en comparación con las ratas de 24m.

Tabla 3. Efecto de la edad y de la RC sobre la composición corporal de ratas de 3m ($n = 35$) y ratas de 24 meses con ($n = 31$) y sin RC ($n = 28$).

	3m	24m	24m- RC
Peso corporal (g)	401,9±7,4	651,3±16,1 ***	541,6±9 ###
Grasa visceral (g/100 g pc)	2,5±0,3	3,7±0,1 ***	2,6±0,2 ###
Grasa subcutánea (g/100 g pc)	1,3±0,1	3,2±0,2 ***	2,4±0,2 ##
Gastrocnemio(g/100 g pc)	0,516±0,014	0,343±0,012 ***	0,397±0,018 #
Corazón (g/100 g pc)	0,376±0,033	0,280±0,018 ***	0,352±0,017 ###

Los datos muestran las medias y S.E.M. Pc: Peso corporal.

*** $P<0.001$ vs. ratas de 3m; # $P<0.05$ vs. ratas de 24m; ## $P<0.01$ vs. ratas de 24m; ### $P<0.001$ vs. ratas de 24m.

1.2. Perfil metabólico

Los niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos, NEFAs y colesterol se muestran en la Tabla 4. Los niveles de glucosa e insulina no se modificaron entre los grupos. Sin embargo, los niveles séricos de triglicéridos y colesterol aumentaron significativamente en las ratas de 24m respecto a los de las ratas de 3m ($P<0,001$ y $P<0,001$, respectivamente). Por el contrario, los niveles séricos de NEFA en las ratas de 24m fueron significativamente más bajos que en los de las ratas de 3m ($P<0.01$). La RC durante 3 meses disminuyó significativamente los niveles de triglicéridos y NEFA ($P<0,05$ para ambos), pero no los niveles séricos de colesterol.

Tabla 4. Los niveles séricos de glucosa (mg/dl), insulina (ng/ml), triglicéridos (mmol/l), ácido graso no esterificado (NEFA, mmol/l) y colesterol (mmol/l) en ratas de 3m, 24m y 24m-RC; (n = 8).

	3m	24m	24m- RC
Glucosa (mg/dl)	132 ± 2	142 ± 2	144 ± 3
Insulina (ng/ml)	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Triglicéridos (mmol/l)	0,37 ± 0,03	0,85 ± 0,10 ***	0,50 ± 0,10 #
NEFA (mmol/l)	0,79 ± 0,01	0,65 ± 0,01 **	0,55 ± 0,02 #
Colesterol (mmol/l)	1,39 ± 0,32	3,76 ± 0,12 ***	3,48 ± 0,35

Los datos muestran las medias y S.E.M.

** P<0.01 vs. ratas de 3m; *** P<0.001 vs. ratas de 3m; # P<0.05 vs. ratas de 24m.

1.3. Parámetros funcionales basales en los corazones perfundidos

La Tabla 5 muestra los parámetros funcionales registrados en los corazones perfundidos de las ratas de 3 y 24 meses con y sin RC en situación basal.

La presión de perfusión en las arterias coronarias fue similar entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, el envejecimiento cursó con un aumento de la presión intraventricular (P<0.05) y una disminución de la frecuencia cardiaca en las ratas de 24m respecto a las de 3m (P<0.001). La RC no produjo diferencias significativas en ninguno de los parámetros funcionales registrados.

Tabla 5. Valores funcionales basales en los corazones perfundidos de ratas de 3m (n = 19) y ratas de 24 meses con y sin RC (n = 18; n = 20, respectivamente).

	3m	24m	24m-RC
Presión de perfusión coronaria (mmHg)	72 ± 5	75 ± 4	78 ± 4
Presión intraventricular (mmHg)	79 ± 4	96 ± 7 *	85 ± 6
dP/dt (mmHg/s)	2194 ± 136	2501 ± 169	2302 ± 170
Frecuencia cardiaca (latidos/s)	232 ± 6	184 ± 9 ***	209 ± 10

Los datos muestran las medias y S.E.M.

* P<0.05 vs. ratas de 3m; *** P<0.001 vs. ratas de 3m

2. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC SOBRE LA RESPUESTA CARDIOVASCULAR A LA ET-1

2.1. Corazón

2.1.1. Vasoconstricción coronaria en respuesta a la ET-1

La Figura 14 muestra la presión de perfusión de las arterias coronarias en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de ET-1 en ratas de 3m y en ratas de 24m sometidas o no a RC.

La vasoconstricción de las arterias coronarias inducida por la ET-1 fue similar en las ratas de 3m y las de 24m-RC, mientras que en las ratas de 24m fue significativamente menor ($P < 0.05$), tal y como muestra la sensibilidad a la ET-1 medida mediante el LogCE_{50} ($P < 0.05$; Tabla 5) con respecto a las ratas de 3m.

La RC aumentó la sensibilidad a la ET-1 en comparación con las ratas de 24m (LogCE_{50} ; $P < 0.05$; Tabla 5). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los valores de E_{max} entre los distintos grupos experimentales.

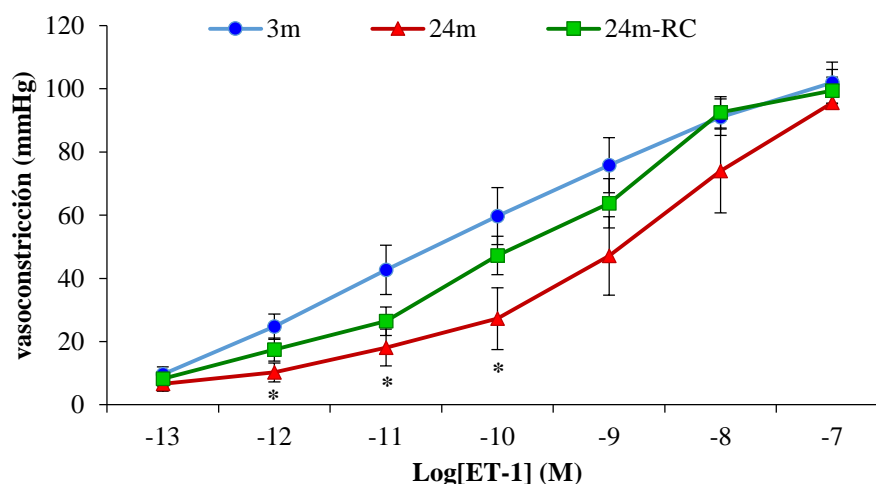


Figura 14. Presión de perfusión en las arterias coronarias de ratas de 3m ($n = 7$) y de ratas de 24m con y sin RC ($n = 8$, respectivamente) en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de ET-1. Cada punto representa la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. ratas de 3m.

Tabla 5. Cambios en la respuesta máxima (E_{\max} , expresada en mmHg) y en el LogCE_{50} para la ET-1 en arterias coronarias de ratas de 3m (n = 7), ratas de 24m (n = 8) y ratas 24m-RC (n = 8).

	3m	24m	24m-RC
Log CE_{50}	-10,32 \pm 0,30	-8,91 \pm 0,34 *	-9,86 \pm 0,26 #
E_{\max} (mmHg)	102 \pm 6	95,63 \pm 10	99,44 \pm 4,21

Los datos muestran las medias y S.E.M.

* $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

2.1.2. Presión intraventricular, contractilidad del miocardio y frecuencia cardíaca en respuesta a la ET-1

La Figura 15 representa los cambios en la presión intraventricular, en la contractilidad del miocárdio (dP/dt) y en la frecuencia cardíaca registrados en los corazones de ratas de 3m, ratas de 24m y ratas de 24m-RC en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de ET-1.

En todos los grupos experimentales la presión intraventricular aumenta en respuesta a dosis bajas de ET-1 y disminuye en respuesta a dosis elevadas de este péptido (Figura 15.A). Este parámetro no se modificó en los corazones de las ratas de 24m en comparación con los corazones de las ratas de 3m. Por el contrario, la RC disminuyó de forma significativa la presión intraventricular en comparación con los corazones de las ratas de 24m a la dosis de 10^{-13} M ($P < 0.05$).

A dosis altas de ET-1 (10^{-8} - 10^{-7} M) la contractilidad cardíaca disminuyó en todos los grupos experimentales (Figura 15.B). En cambio, a dosis bajas de ET-1 (10^{-11} - 10^{-9} M) aumentó la contractilidad en los corazones de las ratas de 24m ($P < 0.05$) pero no en los corazones de las ratas de 3m y 24m-RC. Este efecto se previno con la RC, ya que en las ratas de 24m-RC la contractilidad cardíaca en respuesta a dosis bajas de ET-1 fue menor que la de las ratas de 24m ($P < 0.05$).

En respuesta a dosis altas de ET-1, la frecuencia cardíaca aumentó significativamente en las ratas de 24m en comparación con las ratas de 3m ($P < 0.05$). La RC previno los cambios en la frecuencia cardíaca inducidos por el envejecimiento ($P < 0.05$) (Figura 15.C).

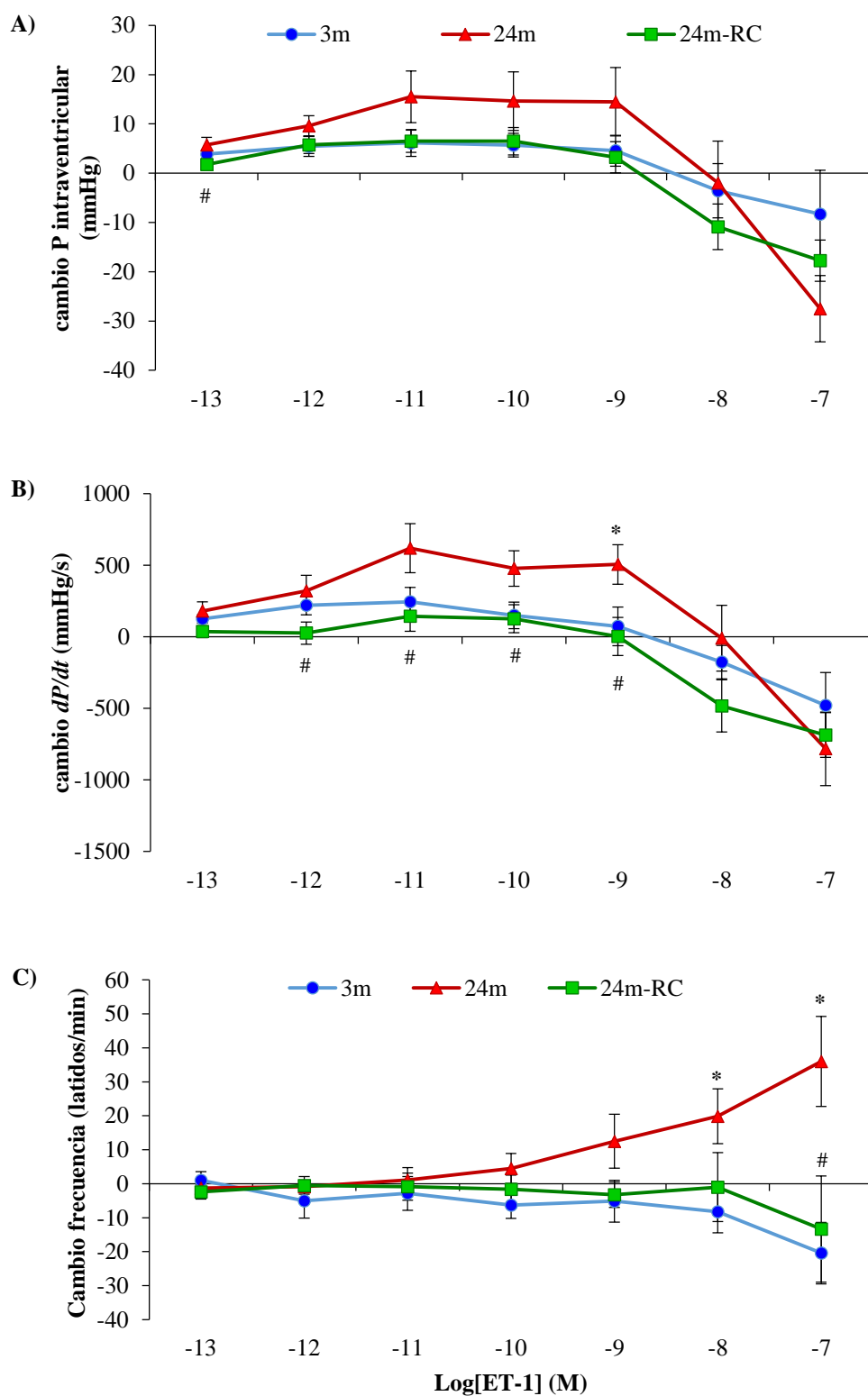


Figura 15. Efectos de la administración de dosis crecientes y acumulativas de ET-1 sobre la presión intraventricular (A), la contractilidad miocárdica (B) y la frecuencia cardíaca (C) en corazones de ratas de 3m (n = 7), ratas de 24m (n = 8) y ratas de 24m-RC (n = 8). Cada punto representa la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

2.1.3. Expresión génica de ET-1, ET_A y ET_B

La Figura 16 muestra los niveles de expresión de los genes ET-1 (A), ET_A (B) y ET_B (C) en los corazones procedentes de ratas de 3m, 24m y 24m-RC tras la administración de dosis crecientes y acumulativas de ET-1.

Los niveles de expresión de ET-1 fueron significativamente superiores en los corazones de las ratas de 24m con respecto a los niveles de expresión en las ratas de 3m ($P < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ET_A entre los diferentes grupos experimentales. Por el contrario, la expresión del receptor ET_B fue significativamente menor en los corazones de las ratas de 24m frente a los de las ratas de 3m ($P < 0.01$) y mayor en las ratas de 24m-RC con respecto a las ratas de 24m ($P < 0.05$).

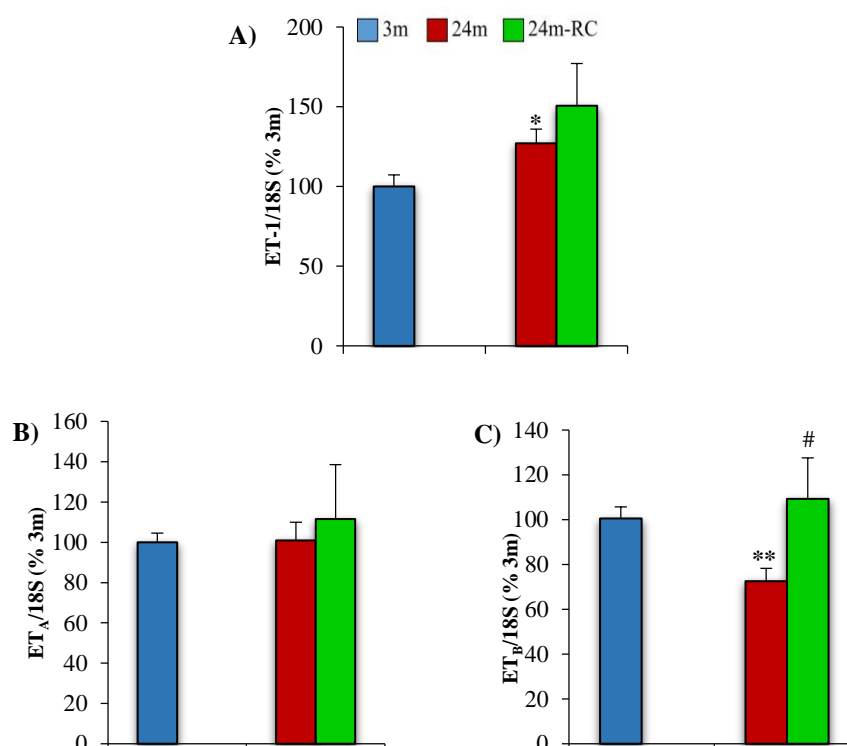


Figura 16. Expresión génica de ET-1 (A), ET_A (B) y ET_B (C) en corazones de ratas de 3m (n = 7), ratas de 24m (n = 8) y ratas de 24m-RC (n = 8). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; ** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

2.1.4. Expresión génica de TGF- β 1, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β

En la Figura 17 se respresenta la expresión génica de TGF- β 1 (A), COX-2 (B), TNF- α (C), IL-6 (D), e IL-1 β (E) en corazones de ratas de 3m, 24, y 24m-RC. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión génica de TGF- β 1, COX-2, IL-6 e IL-1 β entre los distintos grupos experimentales excepto en la expresión génica de TNF- α , que aumentó significativamente en los corazones de ratas de 24m con respecto a ratas de 3m ($P < 0.05$).

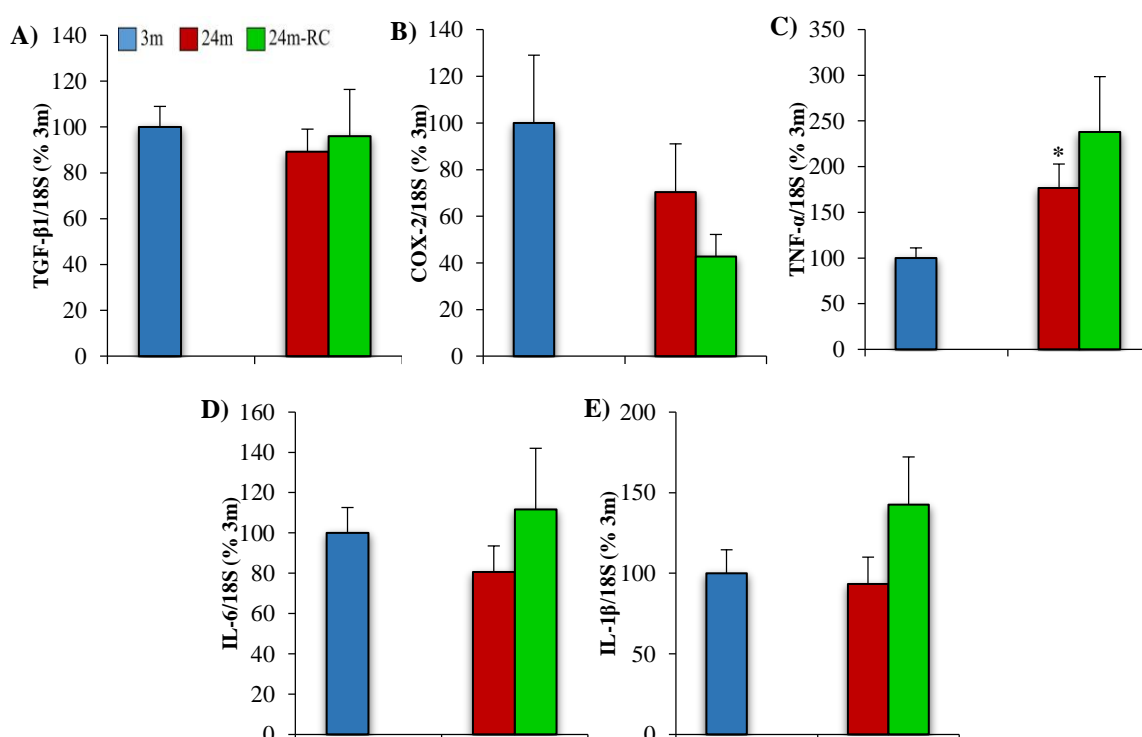


Figura 17. Expresión génica de TGF- β 1 (A), COX-2 (B), TNF- α (C), IL-6 (D) e IL-1 β (E) en corazones de ratas de 3m (n = 7), ratas de 24m (n = 8) y ratas de 24m-RC (n = 8). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. ratas de 3m.

2.1.5. Expresión génica de eNOS, iNOS y nNOS

La Figura 18 muestra los niveles de expresión de los genes de las tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa, eNOS (A), iNOS (B) y nNOS (C) en el corazón de ratas de 3m frente a ratas de 24 meses con y sin RC. La expresión de eNOS fue significativamente menor en los corazones de las ratas de 24m respecto a los corazones de las ratas de 3m ($P < 0.01$), e incrementó significativamente en ratas las de 24m-RC en comparación con las ratas de 24m ($P < 0.05$). En cambio, la expresión génica de la iNOS fue significativamente mayor en los corazones de las

ratas de 24m con respecto a los corazones de ratas de 3m ($P < 0.01$). No se observaron cambios en la expresión génica de la nNOS entre los diferentes grupos experimentales.

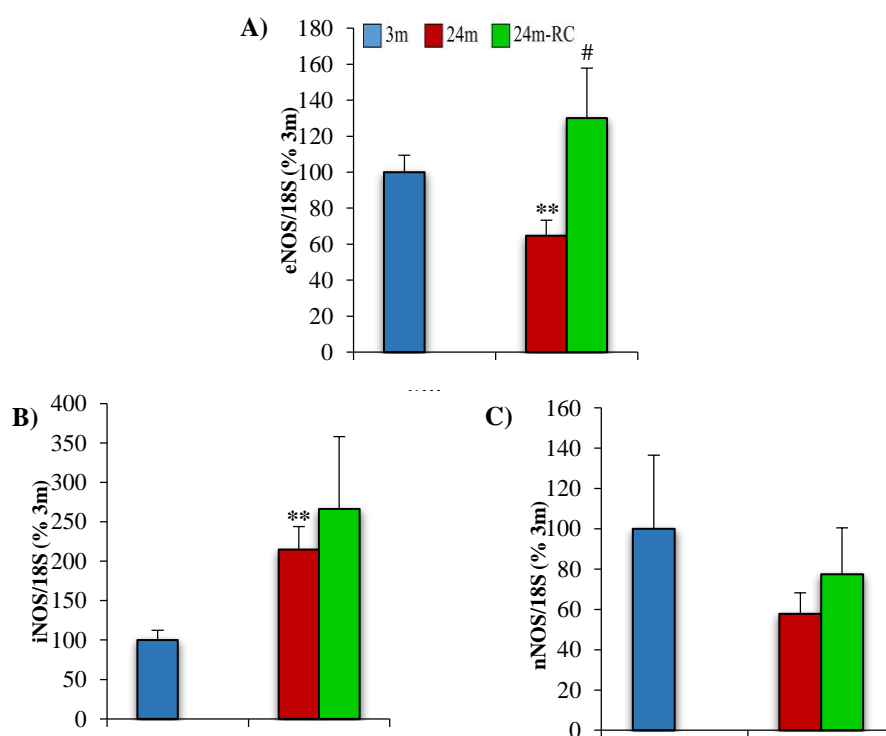
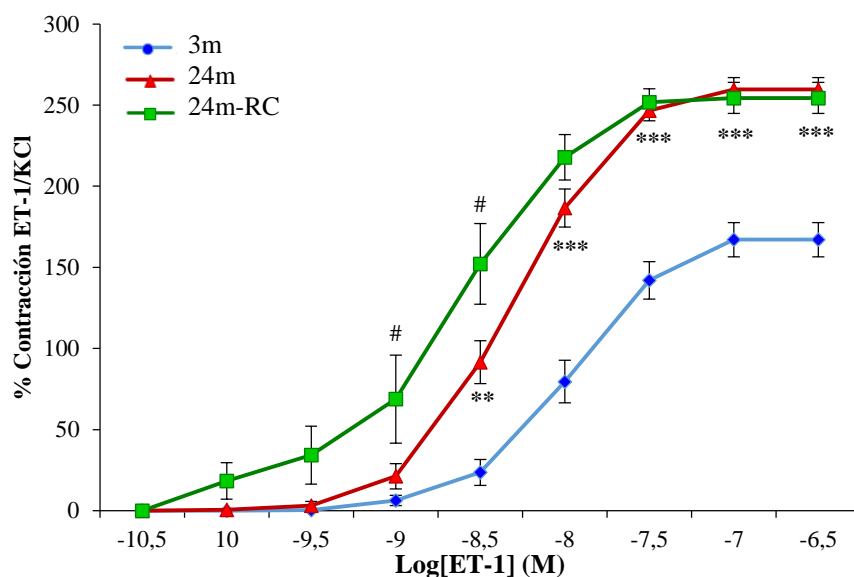


Figura 18. Expresión génica de eNOS (A), iNOS (B) y nNOS (C) en corazones de ratas de 3m ($n = 7$), ratas de 24m ($n = 8$) y ratas de 24m-RC ($n = 8$). Las barras representan la media \pm S.E.M. ** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

2.2.Arterias renales

2.2.1. Respuesta vascular a la ET-1

La Figura 19 muestra la curva dosis-respuesta de la ET-1 y el LogCE_{50} en segmentos de arteria renal de ratas de 3m, 24m y 24m-RC. La respuesta contráctil de la ET-1 fue mayor en ratas de 24m frente a las ratas de 3m, tal y como muestra el valor del LogCE_{50} ($P < 0.001$). Además, en los segmentos de arteria renal de ratas de 24m-RC se observó un incremento en la respuesta a la ET-1 en comparación con las ratas de 24m ($P < 0.05$), efecto que no se vio reflejado en el LogCE_{50} .



	3m	24m	24m-RC
LogCE ₅₀	-7,93 ± 0,07	-8,43 ± 0,09 ***	-8,58 ± 0,11

Figura 19. Respuesta contráctil de segmentos de arteria renal de ratas de 3m (n = 7), ratas de 24m (n = 8) y ratas 24m-RC (n = 8) en respuesta a la ET-1. Cada punto representa la media ± S.E.M. ** P<0.01 vs. ratas de 3m; *** P<0.01 vs. ratas de 3m; # P<0.05 vs. ratas de 24m.

2.2.2. Implicación de los receptores ET_A y ET_B en la respuesta contráctil a la ET-1

El bloqueo del receptor ET_A (BQ-123) desplazó hacia la derecha las curvas dosis-respuesta de la ET-1, lo que se asoció con un aumento en el LogCE₅₀ en todos los grupos experimentales (P<0.01 en 3m; P<0.001 en 24m; P<0.001 en 24m-RC). Además, la preincubación de los segmentos de arteria renal con el receptor ET_A (BQ-123) indujo un incremento significativo en la respuesta contráctil de la ET-1 en los segmentos de arteria renal de las ratas de 3m a la dosis más alta de ET-1 (Figura 20.A; P<0.05) pero no en los de las ratas de 24m y 24m-RC.

La preincubación de segmentos de arterias renales con el antagonista del receptor ET_B (BQ-788) no modificó la respuesta contráctil a la ET-1 en los segmentos procedentes de las ratas de 3m pero desplazó la curva dosis-respuesta hacia la derecha tanto en los de las ratas de 24m como en los de las ratas de 24m-RC respecto a sus respectivos controles (Figura 20.B; Figura 20.C, en cada caso), lo que se acompañó de un aumento significativo del LogCE₅₀ (P<0.05, respectivamente).

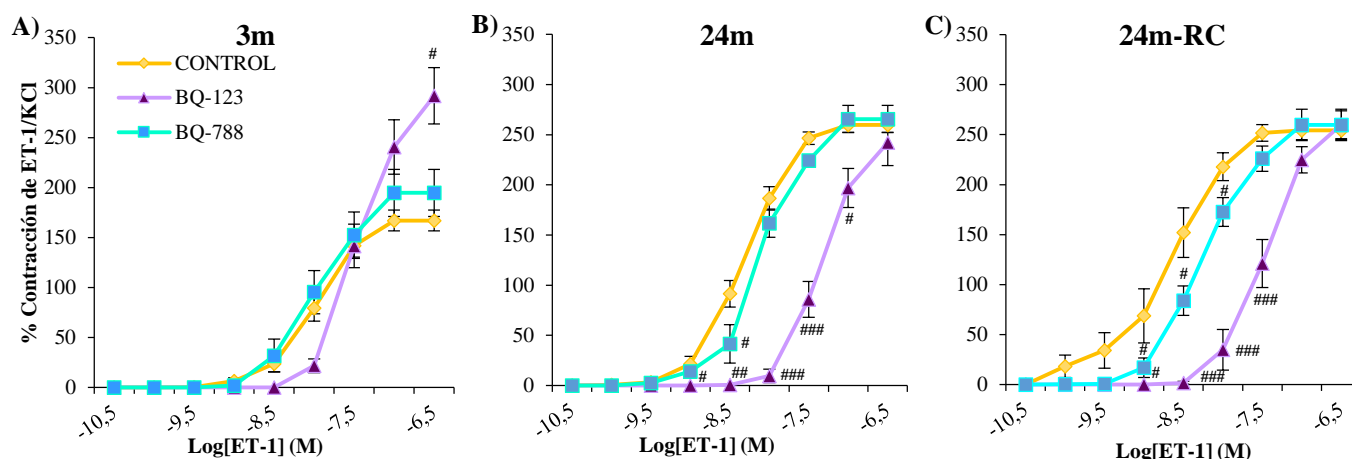
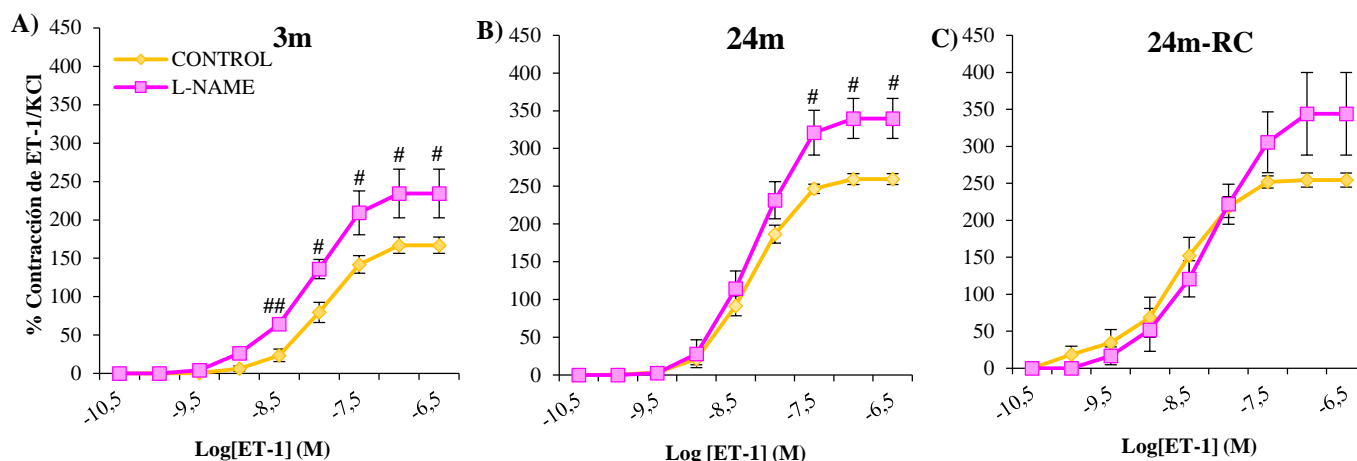


Figura 20. Respuesta contráctil de segmentos de arteria renal de 3m (A; n = 7), de ratas de 24m (B; n = 8) o de ratas de 24m-RC (C; n = 8) y el logaritmo CE₅₀ en respuesta a la ET-1 tras la preincubación con vehículo (Control), BQ-123 (10⁻⁷ M) o BQ-788 (10⁻⁷ M). Cada punto representa la media ± S.E.M. *** P<0.001 vs. ratas de 3m; # P<0.05 vs. Su respectivo Control; ## P<0.01 vs. Su respectivo Control; ### P<0.001 vs. Su respectivo Control.

2.2.3. Implicación del NO en la respuesta contráctil a la ET-1

El bloqueo de la producción de NO mediante la preincubación de algunos de los segmentos de arterias renales con L-NAME aumentó significativamente la respuesta contráctil a la ET-1 en los segmentos procedentes de las ratas de 3m y desplazó hacia la izquierda la curva dosis-respuesta (Figura 21.A), lo que se acompañó de una disminución en el LogCE₅₀ (P<0.05). Igualmente, la respuesta contráctil a la ET-1, previa incubación de los segmentos de arteria renal con L-NAME, fue significativamente mayor en las ratas de 24m (P<0.05; Figura 21.B) y no se vio modificada en las ratas de 24m-RC (Figura 21.C).



LogCE ₅₀	3m	24m	24m-RC
Control	-7,93 ± 0,07	-8,43 ± 0,09 ***	-8,58 ± 0,11
L-NAME	-8,15 ± 0,10 #	-8,25 ± 0,09	-8,45 ± 0,20

Figura 21. Respuesta contráctil de segmentos de arterias renales procedentes de ratas de 3m (A; n = 7), ratas de 24m (B; n = 8) y ratas de 24m-RC (C; n = 8) y el logaritmo de CE₅₀ en respuesta a la ET-1 tras la preincubación con vehículo o con L-NAME (10⁻⁴ M). Cada punto representa la media ± S.E.M. *** P<0.001 vs. ratas de 3m; # P<0.05 vs. Su respectivo control; ## P<0.01 vs. Su respectivo control.

2.2.4. Niveles proteicos de ET-1, ET_A y ET_B

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ET-1 entre los distintos grupos experimentales (3m: 100 ± 9,2; 24m: 146 ± 28,3; 24m-RC: 115,6 ± 10). La expresión proteica de los receptores ET_A (A) y ET_B (B) en arterias renales de ratas de 3m, 24m y 24m-RC se muestran en la Figura 22. El envejecimiento no modificó los niveles de ET_A pero indujo una disminución significativa en los niveles proteicos del receptor ET_B en las ratas de 24m (P<0.05) en comparación con las ratas de 3m. La RC aumentó los niveles de ET_A en las arterias renales de las ratas de 24m (P<0.01) pero no previno la disminución en los niveles de ET_B inducidos por el envejecimiento.

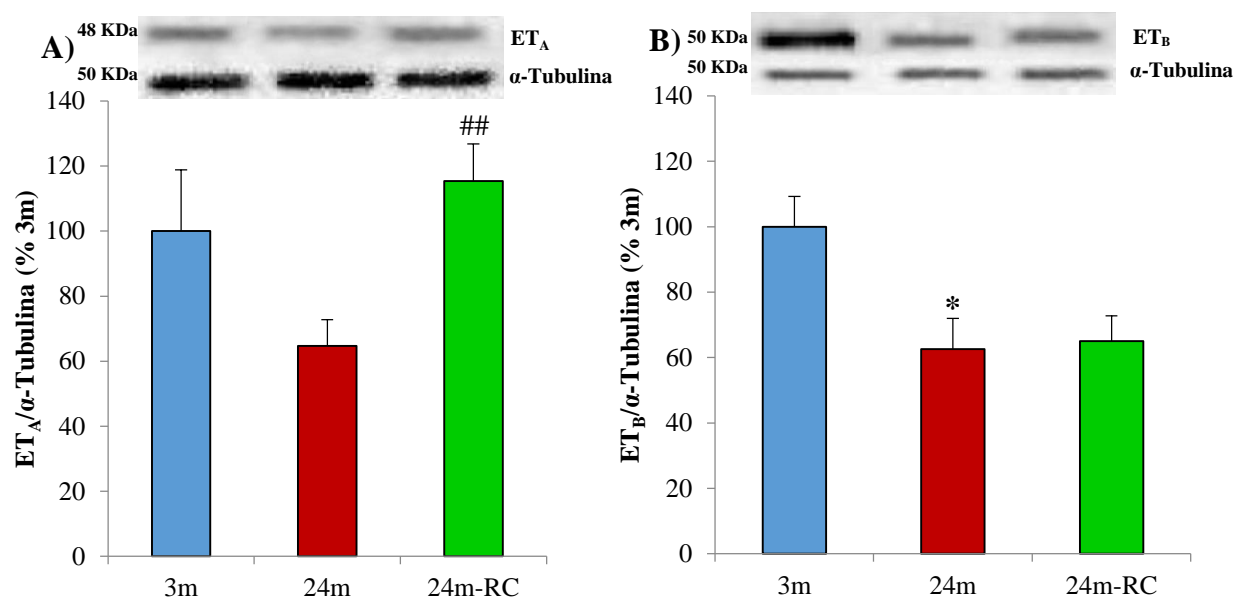


Figura 22. Niveles proteicos de ET_A (A) y ET_B (B) en arterias renales de ratas de 3m (n = 5), ratas de 24m (n = 5) y ratas de 24m-RC (n = 5). Las barras representan la media ± S.E.M. * P<0.05 vs. ratas de 3m; ## P < 0.01 vs. ratas de 24m.

2.2.5. Expresión génica eNOS, iNOS y nNOS

En la Figura 23 se representa la expresión génica de las tres isoformas de la NOS, eNOS (A), iNOS (B) y nNOS (C) en arterias renales de ratas de 3m, 24m y 24m-RC.

La edad disminuyó significativamente la expresión génica de la eNOS (P<0.01) y de la nNOS (P<0.05) y aumentó la expresión de la iNOS (P<0.001) en las arterias renales de las ratas de 24m frente a las de las ratas de 3m. La RC no indujo cambios en la expresión de la nNOS en las arterias renales pero atenuó la disminución en los niveles de mRNA de la eNOS (P<0.05) y la sobreexpresión de la iNOS (P<0.05) inducidas por el envejecimiento.

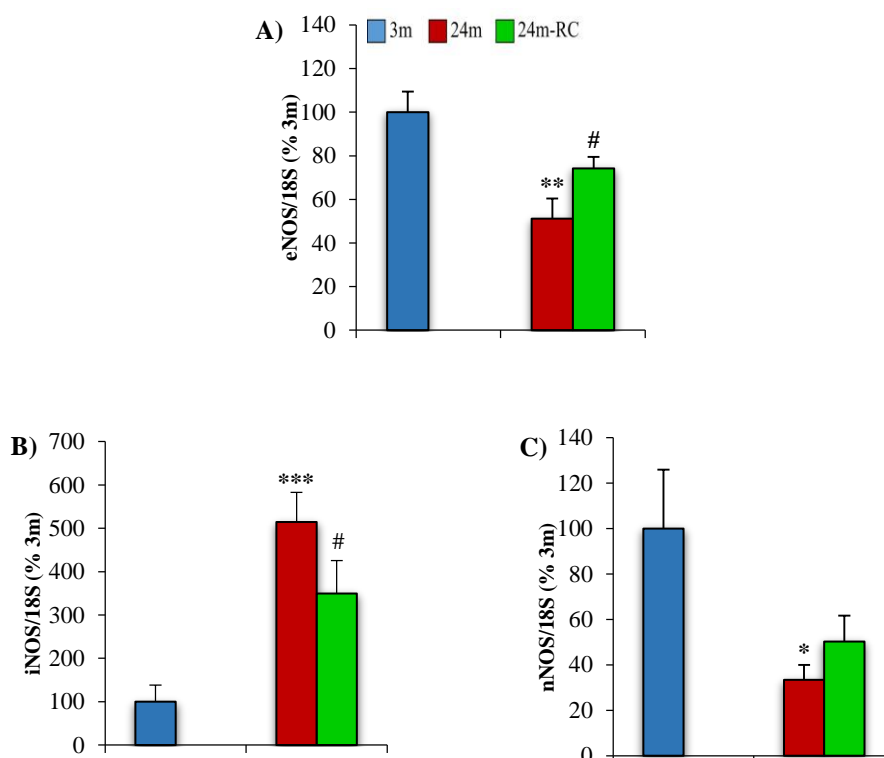


Figura 23. Expresión génica de eNOS (A), iNOS (B) y nNOS (C) en arterias renales de ratas de 3m (n = 7), 24m (n = 8) y 24m-RC (n = 8). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. 3m; ** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; *** $P < 0.001$ vs. ratas de 3m; # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

2.2.6. Expresión génica de TGF- β 1, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β

Tal y como se muestra en la Tabla 6, ni el envejecimiento ni la RC modificaron la expresión génica de TGF- β 1, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , en arterias renales de ratas de los tres grupos experimentales. Sin embargo, el envejecimiento cursó con un aumento en la expresión génica de la COX-2 ($P < 0.05$) que no fue revertido por la RC.

Tabla 6. Niveles de mRNA de TGF- β 1, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en arterias renales de ratas de 3m (n = 7), ratas de 24m (n = 8) y ratas de 24m-RC (n = 8).

Marcador	3m	24m	24m-RC
TGF- β 1	100 \pm 13,2	114 \pm 20,5	127.6 \pm 19,8
COX-2	100 \pm 18,7	289 \pm 55,4 *	266 \pm 74,7
TNF- α	100 \pm 10,9	106 \pm 20,8	127 \pm 30,8
IL-6	100 \pm 13,8	106 \pm 20,9	125 \pm 17,2
IL-1 β	100 \pm 15,4	85 \pm 17,9	123 \pm 19

Los datos muestran las medias y S.E.M.

* P<0.05 vs. 3m.

3. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC SOBRE LA RESPUESTA CARDIOVASCULAR A LA INSULINA

3.1. Corazón

3.1.1. Vasodilatación coronaria en respuesta a la insulina en presencia o ausencia de Wortmanina

La presión de perfusión de las arterias coronarias en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de insulina en ratas de 3m, de 24m y de 24m-RC en presencia o ausencia de Wortmanina se representa en la Figura 24.

En los corazones de ratas de 3m la adición de insulina al sistema de perfusión indujo dilatación de las arterias coronarias a las dosis de 10^{-9} y 10^{-8} M, y contracción a la dosis de 10^{-7} M. Sin embargo, la insulina no indujo relajación coronaria en las ratas de 24m ya que la presión coronaria a las dosis de 10^{-9} y 10^{-8} M fue significativamente mayor en los corazones de las ratas de 24m frente a las ratas de 3m ($P < 0.01$). La preincubación de los corazones con Wortmanina bloqueó la vasodilatación coronaria inducida por la insulina en las ratas de 3m a las dosis de 10^{-9} y 10^{-8} M ($P < 0.001$ y $P < 0.01$, respectivamente) y no produjo cambios significativos en el resto de grupos experimentales. La RC no previno los cambios en la vasodilatación coronaria en respuesta a la insulina inducidos por el envejecimiento ni en presencia ni ausencia de Wortmanina.

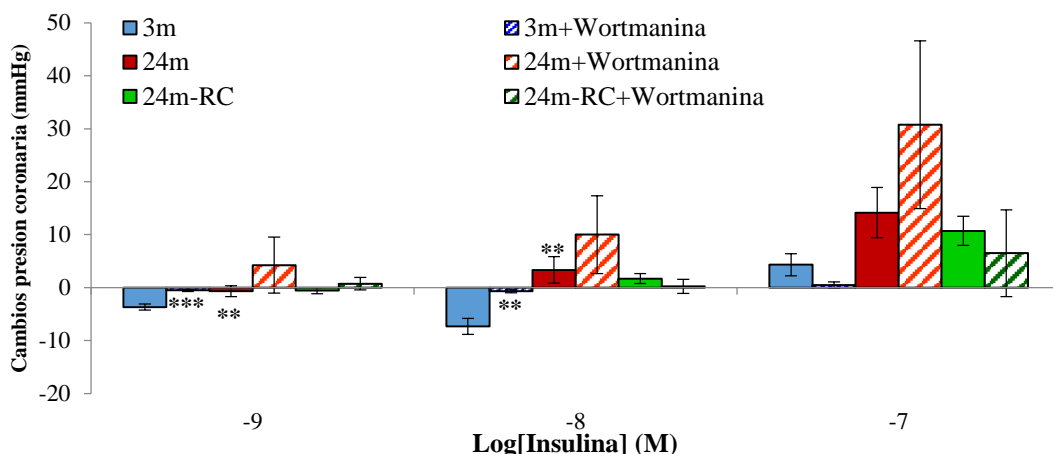


Figura 24. Cambios de la presión de perfusión en las arterias coronarias de ratas de 3m (n = 6), ratas de 24m (n = 6) y ratas 24m-RC (n = 7) en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de insulina, en presencia o ausencia de Wortmanina (10^{-6} M; n = 4, en cada grupo experimental). Las barras representan la media \pm S.E.M. ** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; *** $P < 0.001$ vs. ratas de 3m.

3.1.2. Presión intraventricular, contractilidad del miocardio y frecuencia cardíaca en respuesta a la insulina en presencia o ausencia de Wortmanina

La Figura 25 representa los cambios en la presión intraventricular y en la contractilidad cardíaca (dP/dt) registrados en los corazones de ratas de 3m, ratas de 24m y ratas de 24m-RC en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de insulina, en presencia o ausencia de Wortmanina.

Tanto la presión intraventricular como la contractilidad cardíaca aumentaron en respuesta a la insulina en los corazones de las ratas de 3m a todas las dosis estudiadas. Sin embargo, el envejecimiento cursó con una disminución significativa tanto de la presión intraventricular como de la contractilidad cardíaca (dP/dt) en respuesta a la insulina en comparación con las ratas de 3m a las dosis de 10^{-9} y 10^{-8} M ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente). La RC previno la disminución en la contractilidad y la presión intraventricular en respuesta a la inducida por el envejecimiento a las dosis de 10^{-9} ($P < 0.05$) y 10^{-8} M ($P < 0.05$).

La preincubación con Wortmanina en los corazones de las ratas de 3m indujo una disminución significativa en la presión intraventricular y contractilidad cardíaca en respuesta a la insulina a las dosis de 10^{-9} ($P < 0.05$) y 10^{-8} M ($P < 0.05$) y un aumento a la dosis de 10^{-7} M

($P < 0.001$). En las ratas de 24m-RC, la presión intraventricular en respuesta a la insulina disminuyó significativamente en los corazones preincubados con Wortmanina a la dosis de 10^{-9} M ($P < 0.05$), mientras que la contractilidad cardiaca en respuesta a la insulina disminuyó tanto a la dosis de 10^{-9} ($P < 0.01$) como de 10^{-8} M ($P < 0.05$) con respecto a los corazones no preincubados con Wortmanina de este grupo experimental.

Por último, tal y como se muestra en la Tabla 7, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia cardiaca en respuesta a la insulina en los corazones de los animales de los distintos grupos experimentales.

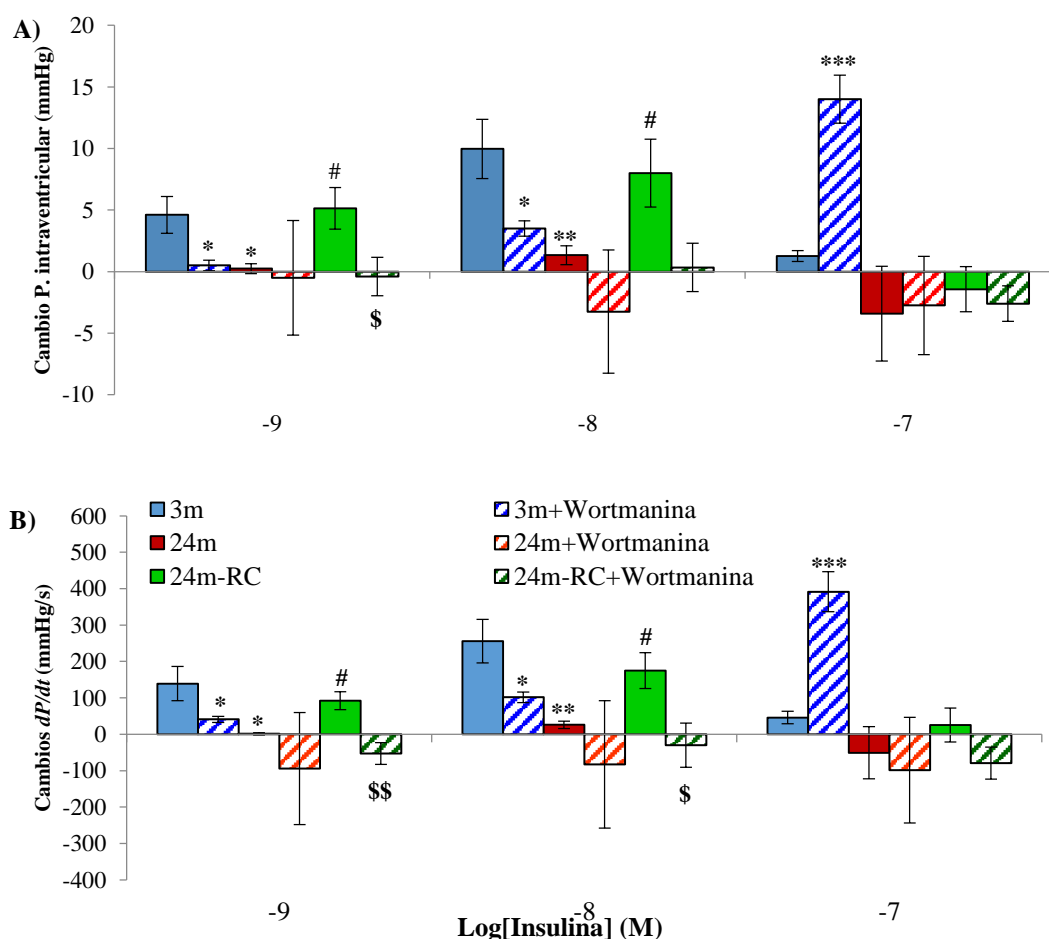


Figura 25. Cambios en la presión intraventricular (A) y en la contractilidad cardiaca (dP/dt ; B) en corazones de ratas de 3m ($n = 6$), ratas de 24m ($n = 6$) y ratas 24m-RC ($n = 7$) en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de insulina, preincubados o no con Wortmanina ($n = 4$, en cada grupo experimental). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; ** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; *** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m; \$ $P < 0.05$ vs. ratas de 24m-RC; \$\$ $P < 0.01$ vs. ratas de 24m-RC.

Tabla 7. Cambios en la frecuencia cardiaca (latidos/s) en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de insulina en corazones de ratas de 3m (n = 6), 24m (n = 6) y 24m-RC (n = 7) preincubados o no con Wortmanina (n = 4, en cada grupo experimental).

Frecuencia cardiaca (latidos/s)	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M
3m	-1±1	2±3	4±2
24m	3±2	5±2	7±3
24m- RC	1±2	0±2	4±3
3m + Wortmanina	-1±1	-2±2	-3±7
24m+ Wortmanina	0±1	6±3	-4±5
24m- RC + Wortmanina	-2±2	2±3	7±5

Los datos muestran las medias y S.E.M.

3.1.3. Activación de las vías de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK en respuesta a la insulina

En la Figura 26 se representa la relación proteica de p-Akt/Akt (A), de p-MAPK/MAPK (B) y la relación proteica de Akt/MAPK (C) medida en corazones de ratas de 3m, 24m y 24m-RC tratados o no con insulina.

Basalmente, no se encontraron diferencias significativas en la relación p-Akt/Akt en ningún grupo experimental (Figura 26.A). Sin embargo, la insulina incrementó los niveles proteicos de la forma activa, p-Akt, en los tres grupos experimentales ($P<0.001$ en 3m y 24m-RC y $P<0.01$ en 24m).

La relación p-MAPK/MAPK (Figura 26.B), disminuyó significativamente en condiciones basales en los corazones de las ratas de 24m con respecto a la de los corazones de las ratas de 3m ($P<0.05$), y la la RC no previno estos cambios. En respuesta a la insulina el ratio p-MAPK/MAPK disminuyó significativamente en los corazones de las ratas de 3m ($P<0.01$) y aumentó en los de las ratas 24m-RC frente a su condición basal ($P<0.05$).

Por último, en condiciones basales el ratio Akt/MAPK (Figura 26.C) fue significativamente mayor en los corazones de las ratas de 24m-RC en comparación con el de las ratas de 24m

($P < 0.05$). Este ratio aumentó significativamente en respuesta a la insulina en los corazones de las ratas de 3m ($P < 0.001$) y de 24m-RC ($P < 0.01$) pero no en los corazones de las ratas de 24m.

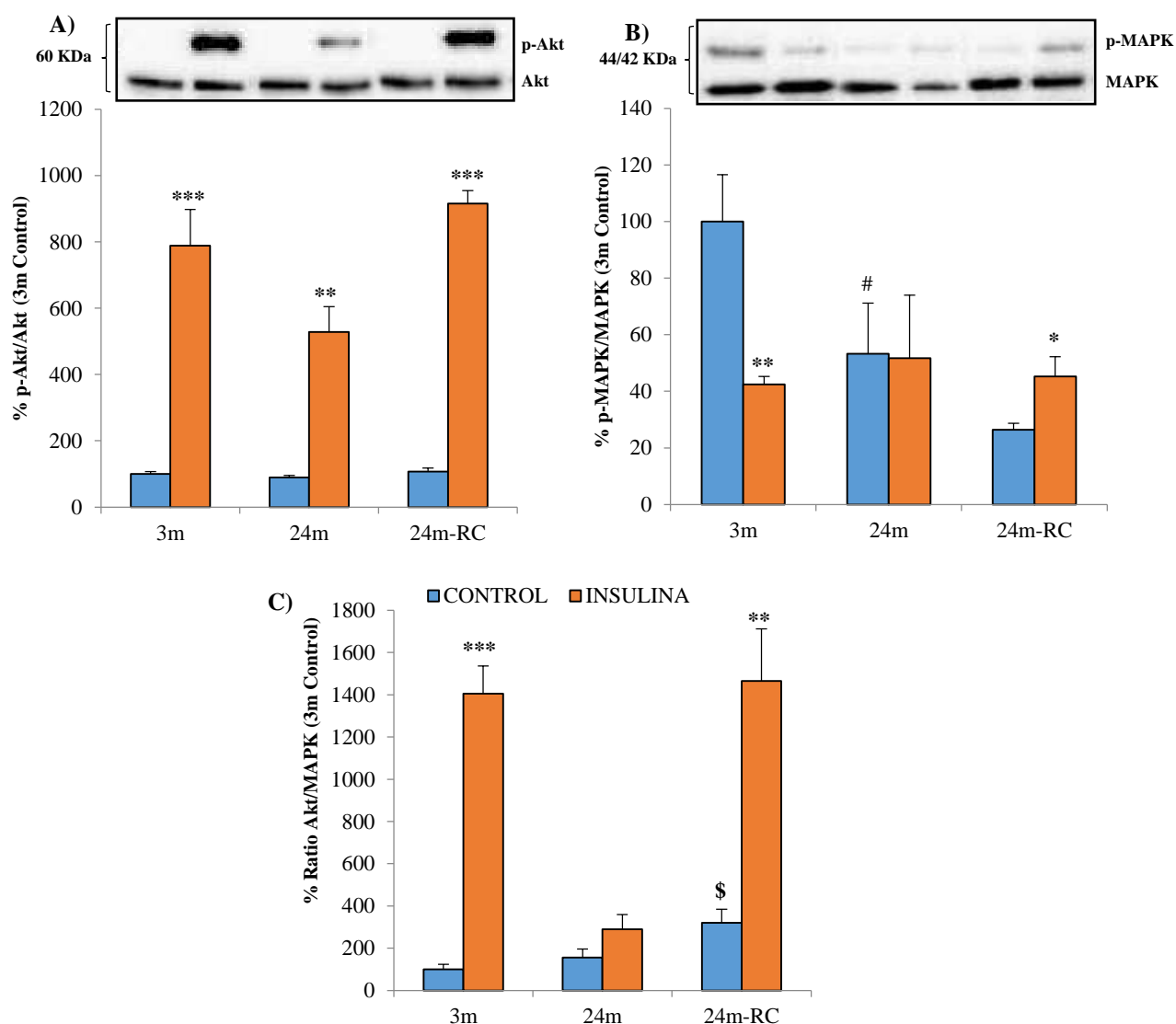


Figura 26. Niveles proteicos de Akt y MAPK en el corazón de ratas de 3m ($n = 4$), ratas de 24m ($n = 4$) y ratas de 24m-RC ($n = 4$) en los que se realizó o no una curva de insulina. **A.** Relación entre Akt fosforilado y el contenido total de Akt. **B.** Relación entre MAPK fosforilado y el contenido total de MAPK. **C.** Relación entre el ratio de Akt y el ratio de MAPK. Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. su respectivo control; ** $P < 0.01$ vs. su respectivo control; *** $P < 0.001$ vs. su respectivo control; # $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; \$ $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

3.1.4. Expresión génica de GLUT-4, IR, ET-1 y eNOS en respuesta a la insulina

En la Figura 27 se representa la expresión génica de GLUT-4 (A), IR (B), ET-1 (C) y de eNOS (D) en corazones de ratas de 3m, 24m y 24m-RC tratados o no con insulina. Los resultados muestran, un incremento significativo de la expresión génica basal de ET-1 ($P < 0.01$),

y una disminución de la expresión génica de la eNOS en los corazones de las ratas de 24m con respecto a los corazones de las ratas de 3m ($P<0.05$). Por otro lado, la RC indujo una disminución de la expresión del GLUT-4 ($P<0.01$) y de la eNOS ($P<0.05$) en el corazón de ratas de 24m-RC en comparación con los corazones de las ratas 24m.

La insulina aumentó significativamente la expresión del GLUT-4 ($P<0.05$), IR ($P<0.05$) y de la eNOS ($P<0.05$) en las ratas de 3m, mientras que en las ratas de 24m disminuyó los niveles de mRNA del IR ($P<0.05$). Por último, el tratamiento con insulina aumentó la expresión del GLUT-4 ($P<0.05$) y disminuyó la expresión de la ET-1 en las ratas de 24m-RC ($P<0.05$).

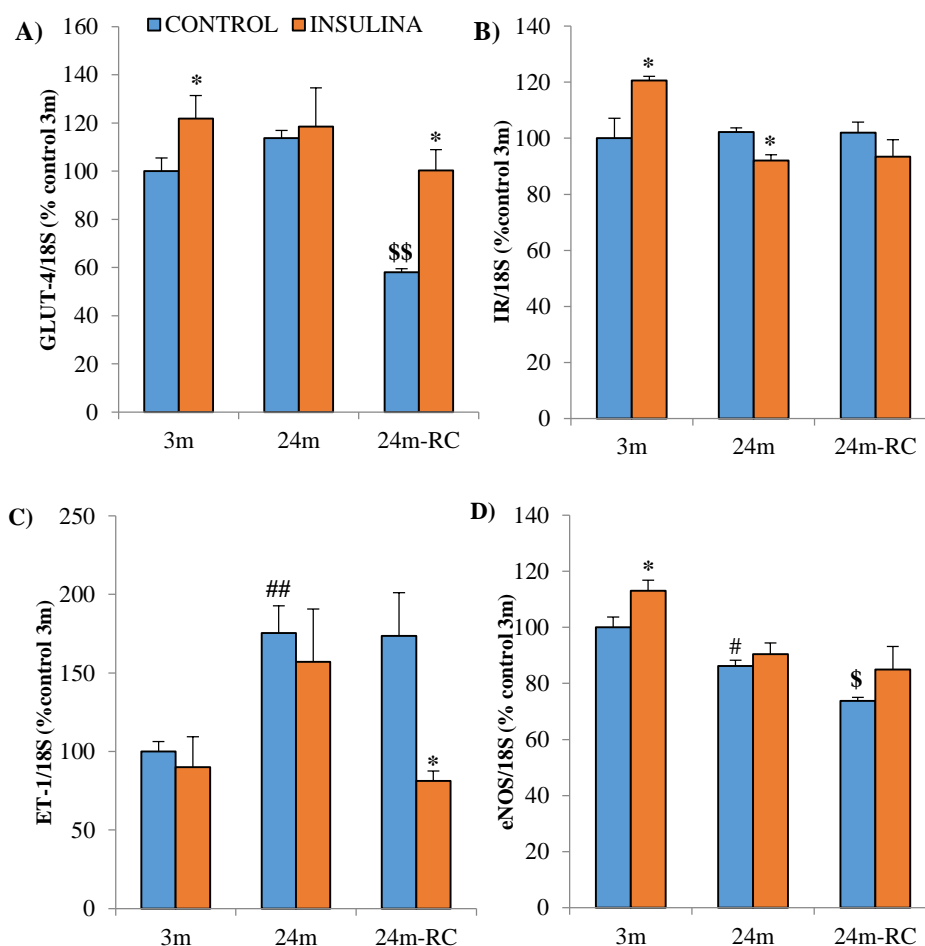


Figura 27. Expresión génica del GLUT-4 (A), IR (B), ET-1 (C) y de la eNOS (D) en corazones de ratas de 3m ($n = 9$), ratas de 24m ($n = 7$) y ratas de 24m-RC ($n = 7$) tratados o no con insulina. Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P<0.05$ vs. su respectivo control; # $P<0.05$ vs. ratas de 3m; ## $P<0.01$ vs. ratas de 3m. \$ $P<0.05$ vs. ratas de 24m; \$\$ $P<0.01$ vs. ratas de 24m.

3.2.Aorta

3.2.1. Resultados en segmentos de aorta no rodeados por PVAT

3.2.1.1. Relajación en respuesta a la insulina en presencia o no de L-NAME

En condiciones basales la relajación en respuesta a la insulina (Figura 28.D), fue menor en los segmentos de aorta procedentes de las ratas de 24m que en los segmentos de aorta procedentes de las ratas de 3m a las dosis de 10^{-7} ($P<0.01$) y $10^{-6.5}$ - $10^{-5.5}$ M ($P<0.001$), lo que se acompañó de una reducción significativa del LogCE_{50} ($P<0.05$). La RC aumentó significativamente la relajación en respuesta a la insulina en comparación con las ratas de 24m en las dosis de $10^{-6.5}$ - $10^{-5.5}$ M ($P<0.05$), lo que se acompañó de un aumento en el LogCE_{50} ($P<0.01$).

El bloqueo de la producción de NO mediante L-NAME disminuyó significativamente la respuesta vasodilatadora a la insulina en las ratas de 3m (Figura 28.A) acompañándose de un aumento en el LogCE_{50} ($P<0.05$). Del mismo modo, la relajación en respuesta a la insulina, previa incubación de los segmentos aórticos con L-NAME, disminuyó en las ratas de 24m (Figura 28.B) y 24m-RC (Figura 28.C) sin observarse cambios en el LogCE_{50} .

Asimismo, cuando comparamos los segmentos aórticos de los 3 grupos experimentales en respuesta a la insulina y en presencia de L-NAME (Figura 28.E), observamos una menor vasodilatación en respuesta a la insulina en las ratas de 24m a las dosis de $10^{-6.5}$ ($P<0.05$), 10^{-6} ($P<0.01$) y $10^{-5.5}$ M ($P<0.001$), efecto que se acompañó de una disminución significativa en el LogCE_{50} ($P<0.01$). En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre los segmentos de aorta de las ratas 24m-RC frente a las ratas de 24m en estas condiciones experimentales.

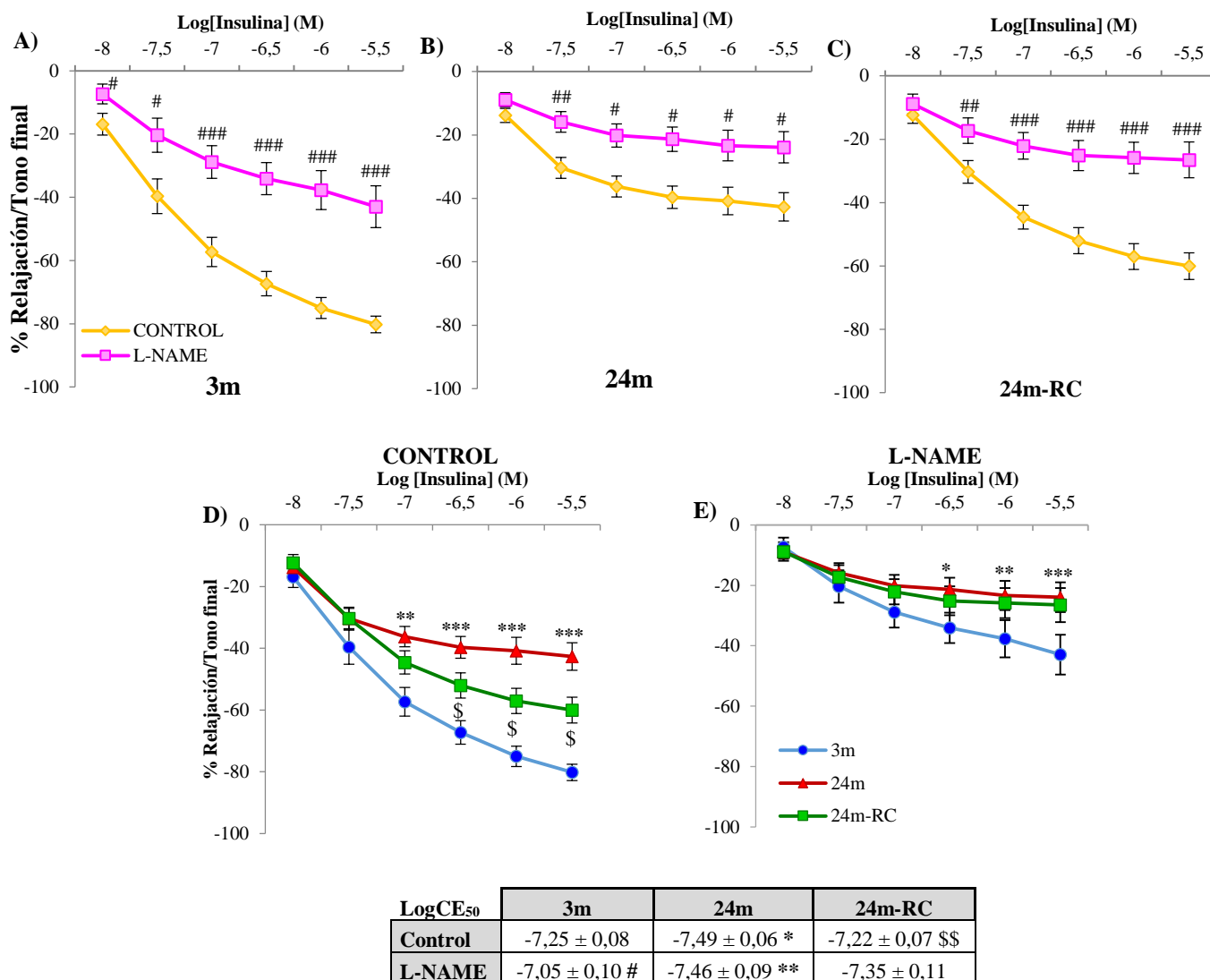


Figura 28. Relajación de segmentos de arteria aorta de ratas de 3m (n = 22), de 24m (n = 20) y de 24m-RC (n = 24) en respuesta a la insulina tras la preincubación o no con L-NAME. Cada punto representa la media ± S.E.M. * P<0.05 vs ratas de 3m; ** P<0.01 vs. ratas de 3m; *** P<0.001 vs. ratas de 3m. \$ P<0.05 vs. ratas de 24m; \$\$ P<0.01 vs. ratas de 24m; # P<0.05 vs. su respectivo control; ## P<0.01 vs. su respectivo control; ### P<0.001 vs. su respectivo control.

3.2.1.2. Liberación de NO₂ + NO₃ en respuesta a la insulina

La Figura 29 muestra la liberación de NO₂ + NO₃ (μM) basal e inducida por la insulina en los segmentos de aorta de ratas de 3m, 24m y 24m-RC.

Basalmente, el envejecimiento disminuyó significativamente la liberación de NO₂ + NO₃ por los segmentos de aorta en las ratas de 24m (P<0.001) respecto a las ratas de 3m y dicho efecto no se vio afectado por la RC. Sin embargo, la insulina indujo una mayor liberación de NO₂ + NO₃

en los segmentos de aorta de las ratas de 3m ($P<0.05$) y de las ratas de 24m-RC ($P<0.05$), y una disminución en los segmentos de ratas de 24m ($P<0.05$).

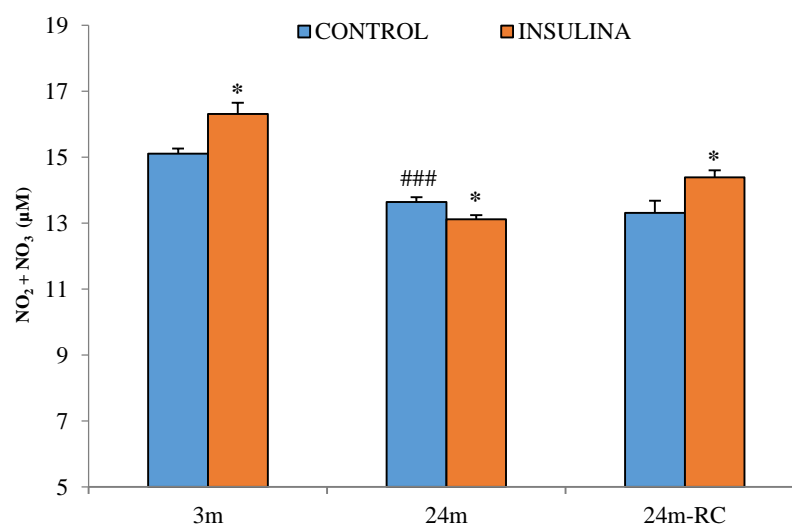


Figura 29. Liberación de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ por segmentos de aorta de ratas de 3m ($n = 24$), ratas de 24m ($n = 20$) y ratas de 24m-RC ($n = 25$) preincubados o no con insulina (10^{-7} M). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P<0.05$ vs. su respectivo control; ### $P<0.001$ vs. ratas de 3m.

3.2.1.3. Vasoconstricción en respuesta a la insulina

La Figura 30 representa la contracción en respuesta a dosis crecientes y acumulativas de insulina en los segmentos de aorta de ratas de 3m, 24m y 24m-RC. El envejecimiento indujo una mayor contracción en los segmentos de aorta a dosis altas de insulina (10^{-6} y $10^{-5.5}$ M; $P<0.05$) respecto a los de las ratas de 3m, lo que se acompañó con una disminución del LogCE_{50} ($P<0.01$). La RC previno el aumento en la contracción inducido por el envejecimiento, ya que la contracción en respuesta a la dosis más alta de insulina es significativamente menor en los segmentos de aorta procedentes de las ratas de 24m-RC en comparación con los de las ratas de 24m ($P<0.05$).

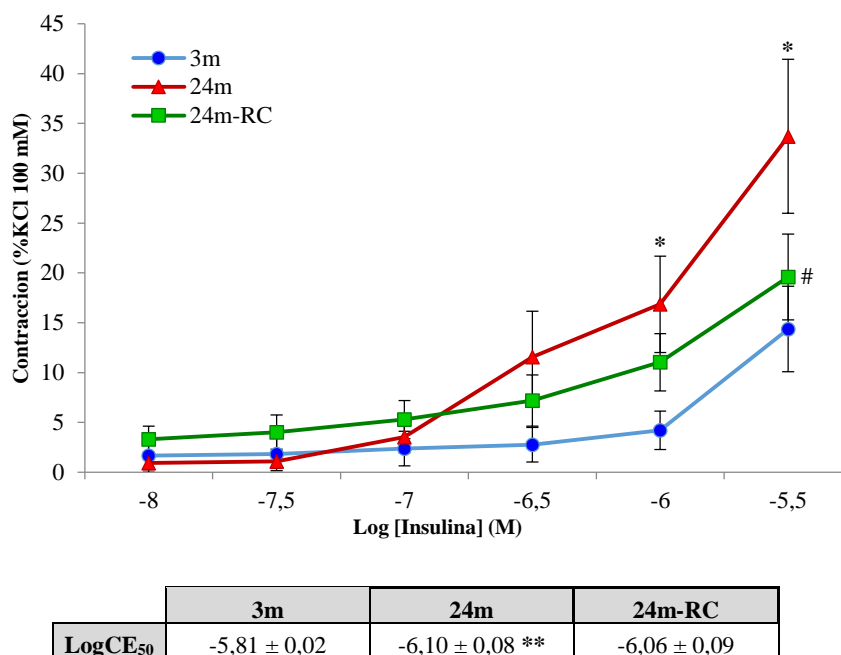


Figura 30. Contracción de segmentos de arteria aorta procedentes de ratas de 3m (n = 25), ratas de 24m (n = 28) y ratas de 24m-RC (n = 39) en respuesta a una curva dosis-respuesta de insulina. Cada punto representa la media ± S.E.M. * P<0.05 vs. ratas de 3m; # P<0.05 vs. ratas de 24m.

3.2.1.4. Vasoconstricción en respuesta a la insulina en presencia de Losartán, BQ-123 o Furegrelato

En la Figura 31 se muestra la vasoconstricción en respuesta a la insulina de segmentos de aorta procedentes de ratas de 3m, ratas de 24m y ratas de 24m-RC preincubadas con vehículo (control), Losartán (10^{-5} M), BQ-123 (10^{-6} M), y Furegrelato (10^{-6} M), en respuesta a la dosis de $10^{-5.5}$ M de insulina. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la contracción en respuesta a la insulina fue significativamente mayor en los segmentos de aorta procedentes de las ratas de 24m con respecto a los de las ratas de 3m ($P<0.05$) y la RC previno este efecto ($P<0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la contracción de los segmentos de arteria aorta en respuesta a la insulina $10^{-5.5}$ M con ninguno de los bloqueantes utilizados, excepto en los segmentos de aorta de ratas de 24m-RC preincubados con Furegrelato, donde la contracción aumentó significativamente en comparación con su control ($P<0.01$).

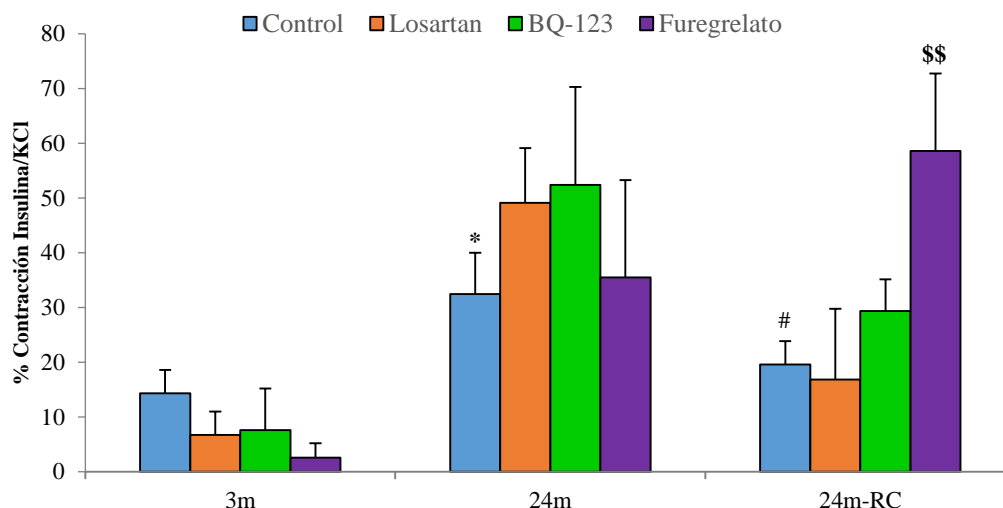


Figura 31. Contracción de segmentos de arteria aorta procedentes de ratas de 3m (n = 25), ratas de 24m (n = 28) y ratas de 24m-RC (n = 39) en respuesta a insulina $10^{-5.5}$ M tras la preincubación con vehículo (Control), Losartán (10^{-5} M), BQ-123 (10^{-6} M) o Furegrelato (10^{-6} M). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P<0.05$ vs. ratas de 3m; # $P<0.05$ vs. ratas de 24m; \$\$ $P<0.01$ vs. su respectivo control.

3.2.1.5. Activación de las vías de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK en respuesta a la insulina

En la Figura 32 se representa la relación proteica de p-eNOS/eNOS (A), de p-Akt/Ak (B), de p-MAPK/MAPK (C) y el ratio Akt/MAPK (D) en segmentos de aorta de ratas de 3m, 24m y 24m-RC preincubados o no con insulina (10^{-7} M). En condiciones basales, el envejecimiento cursó con un aumento significativo de la relación proteica p-MAPK/MAPK ($P<0.01$) y con una disminución de la relación Akt/MAPK ($P<0.01$) en las arterias de las ratas de 24m con respecto a las de 3m. La RC no modificó la relación p-MAPK/MAPK pero si incrementó significativamente el ratio p-Akt/Akt ($P<0.05$) y la relación Akt/MAPK ($P<0.05$). Ni el envejecimiento ni la RC produjeron cambios en la relación proteica p-eNOS/eNOS.

La insulina, aumentó las relaciones p-eNOS/eNOS ($P<0.05$), p-Akt/Akt ($P<0.01$) y p-MAPK/MAPK ($P<0.01$) en las aortas de las ratas de 3m, y las relaciones p-eNOS/eNOS ($P<0.05$) y p-Akt/Akt ($P<0.05$) en las aortas de las ratas de 24m-RC ($P<0.05$). En cambio, no se encontraron diferencias significativas en ninguna relación proteica en las aortas de ratas de 24m en respuesta a la insulina.

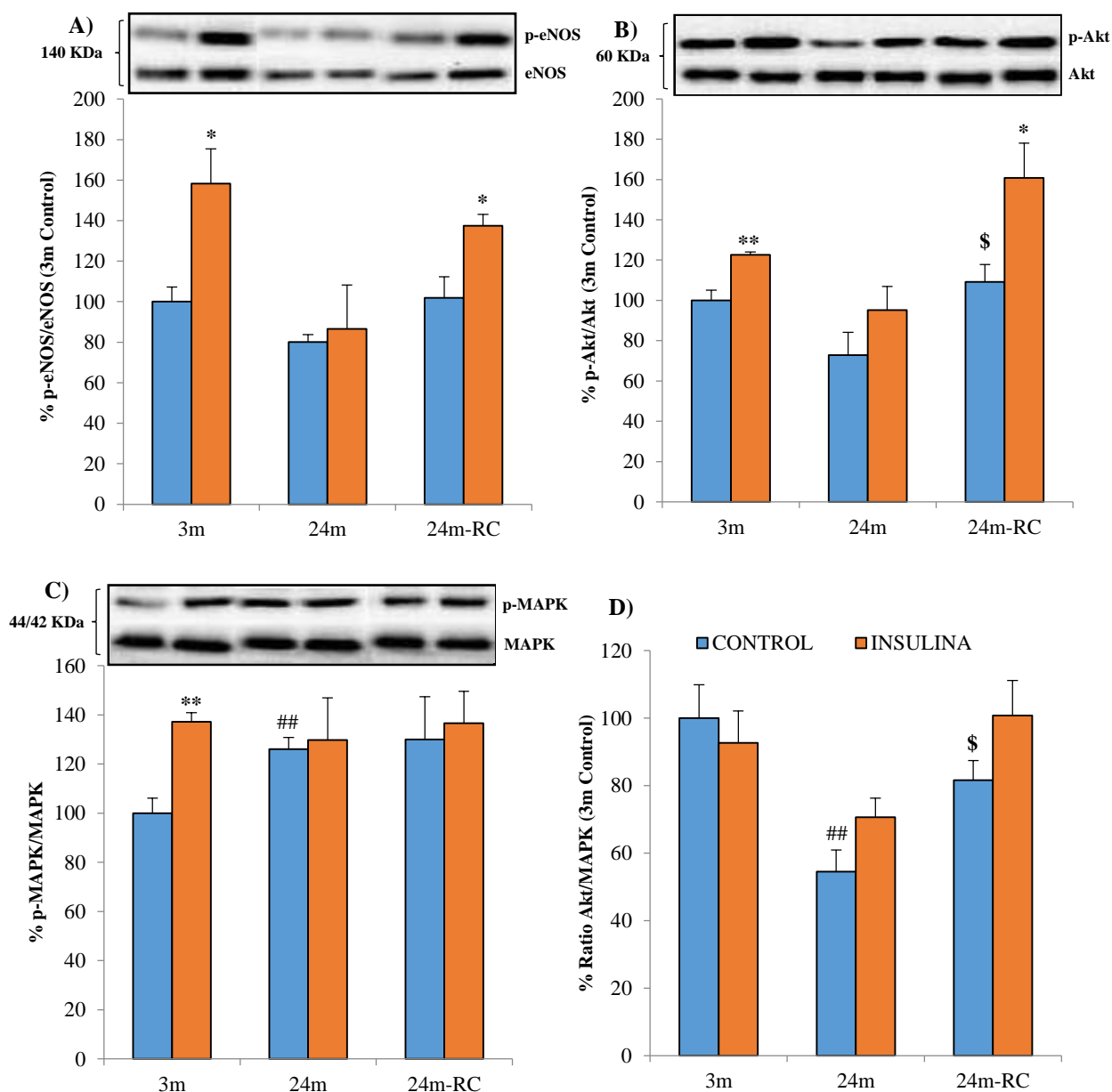


Figura 32. Niveles proteicos de eNOS, Akt y MAPK en segmentos de arteria aorta de ratas de 3m (n = 4), ratas de 24m (n = 4) y ratas de 24m-RC (n = 4) preincubados o no con insulina 10^{-7} M. **A.** Relación entre eNOS fosforilado y el contenido total de eNOS. **B.** Relación entre Akt fosforilado y el contenido total de Akt. **C.** Relación entre MAPK fosforilado y el contenido total de MAPK. **D.** Relación entre el ratio de Akt y el ratio de MPK. Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. su respectivo control; ** $P < 0.01$ vs. su respectivo control; ## $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; \$ $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

3.2.1.6. Expresión génica de eNOS, IR y GLUT-4 en respuesta a la insulina

La expresión génica de la eNOS (A), IR (B) y GLUT-4 en segmentos de aorta procedentes de ratas de 3m, 24m y 24m-RC incubados o no con insulina (10^{-7} M) se representan en la Figura 33. En condiciones basales, el envejecimiento disminuyó la expresión génica del IR ($P<0.05$) y del GLUT-4 ($P<0.05$) con respecto a los segmentos de aorta de ratas de 3m, mientras que la RC aumentó significativamente la expresión génica del IR ($P<0.05$).

La incubación con insulina incrementó la expresión génica de la eNOS ($P<0.05$) y del IR ($P<0.05$) en las aortas de las ratas de 3m, mientras que en las ratas de 24m y 24m-RC la insulina no produjo cambios en la expresión génica de ambos genes.

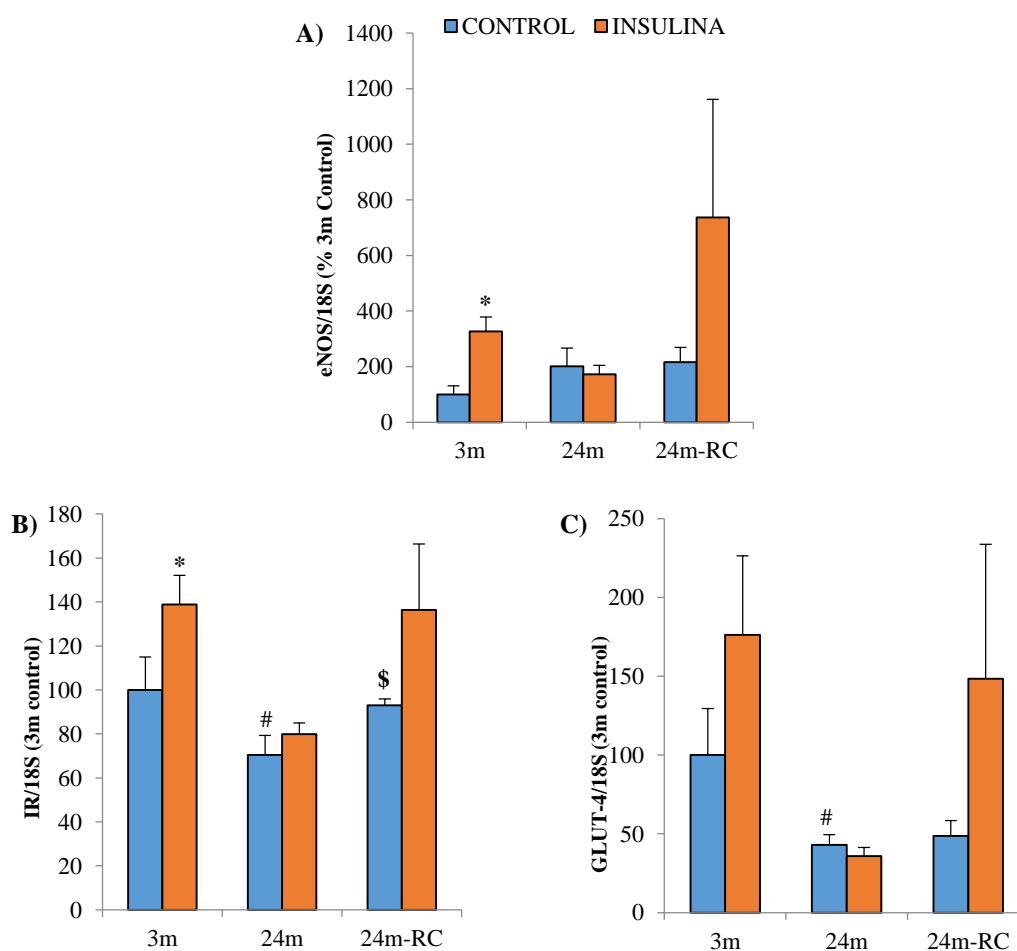


Figura 33. Expresión génica de la eNOS (A), IR (B) y GLUT-4 (C) en segmentos de aorta de ratas de 3m ($n = 4$), ratas de 24m ($n = 4$) y ratas de 24m-RC ($n = 5$) preincubados o no con insulina (10^{-7} M). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P<0.05$ vs. su respectivo control; # $P<0.05$ vs. ratas de 3m; \$ $P<0.05$ vs. ratas de 24m.

3.2.2. Resultados en segmentos de aorta rodeados de PVAT

3.2.2.1. Expresión génica de eNOS, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el PVAT

En la Figura 34 se muestran los resultados de la expresión génica de la eNOS (A), iNOS (B), COX-2 (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e IL-1 β (F) en el PVAT de ratas de 3m, 24m y 24m-RC.

Los niveles de mRNA de la eNOS ($P < 0.001$), iNOS ($P < 0.01$), TNF- α ($P < 0.01$) e IL-1 β ($P < 0.05$) fueron significativamente más altos en el PVAT de las ratas de 24m respecto al de las ratas de 3m. La RC disminuyó los niveles de ARNm de la eNOS ($P < 0.05$), iNOS ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.05$) e IL-1 β ($P < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en el resto de marcadores inflamatorios estudiados.

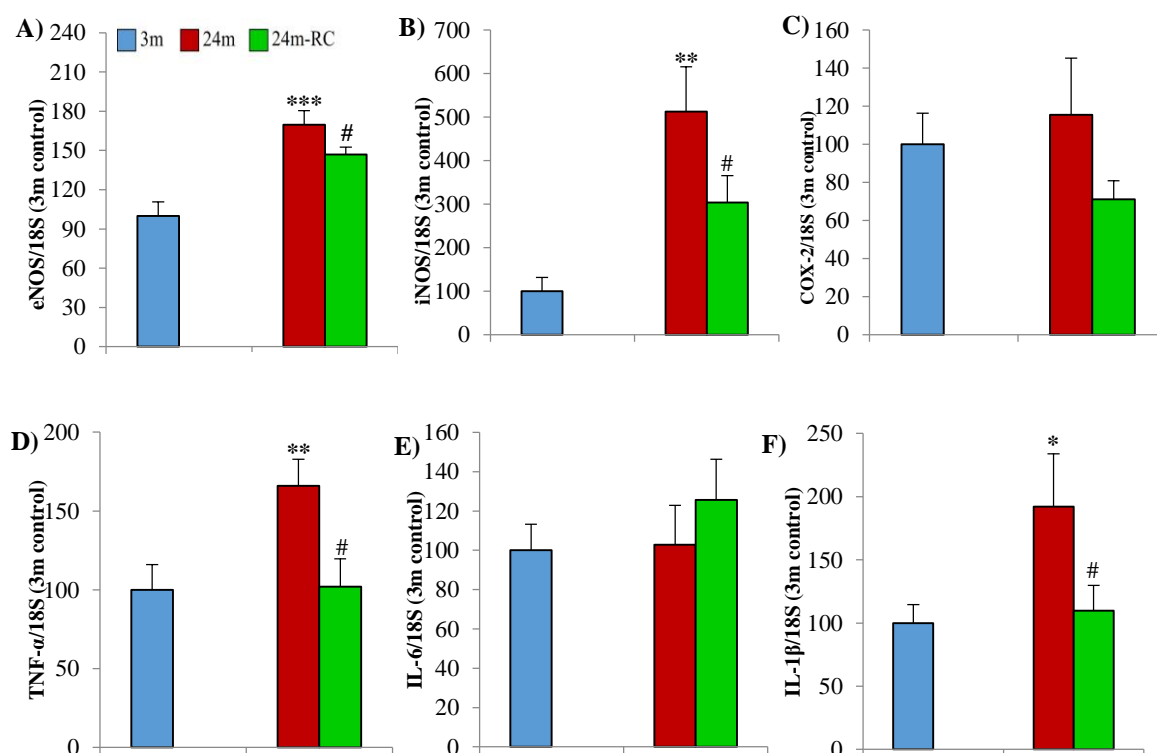


Figura 34. Expresión génica de la eNOS (A), iNOS (B), COX-2 (C), TNF- α (D), IL-6 (E) y de IL-1 β (F) en el PVAT de ratas de 3m ($n = 9$), ratas de 24m ($n = 8$) y de 24m-RC ($n = 8$). * $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; ** $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; *** $P < 0.001$ vs. ratas de 3m # $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

3.2.2.2. Efecto del PVAT en la relajación en respuesta a la insulina

En la Figura 35 se representa la relajación en respuesta a una curva dosis-respuesta de insulina en segmentos de aorta procedentes de ratas de 3 m, ratas de 24 m y ratas de 24m-RC recubiertos o no con PVAT y preincubados en presencia o ausencia de L-NAME.

La presencia de PVAT alrededor de la aorta redujo la relajación en respuesta a la insulina a las dosis de 10^{-8} ($P<0.01$), $10^{-7.5}$ ($P<0.01$) y 10^{-7} ($P<0.05$), y aumentó significativamente el LogCE_{50} ($P<0.01$) en las ratas de 3m (Figura 35.A). Por el contrario, la preincubación con L-NAME de segmentos de aorta rodeados con PVAT (PVAT+L-NAME) indujo una mayor relajación en respuesta a la insulina a la dosis de $10^{-5.5}$ M ($P<0.05$) y un aumento significativo del LogCE_{50} ($P<0.05$).

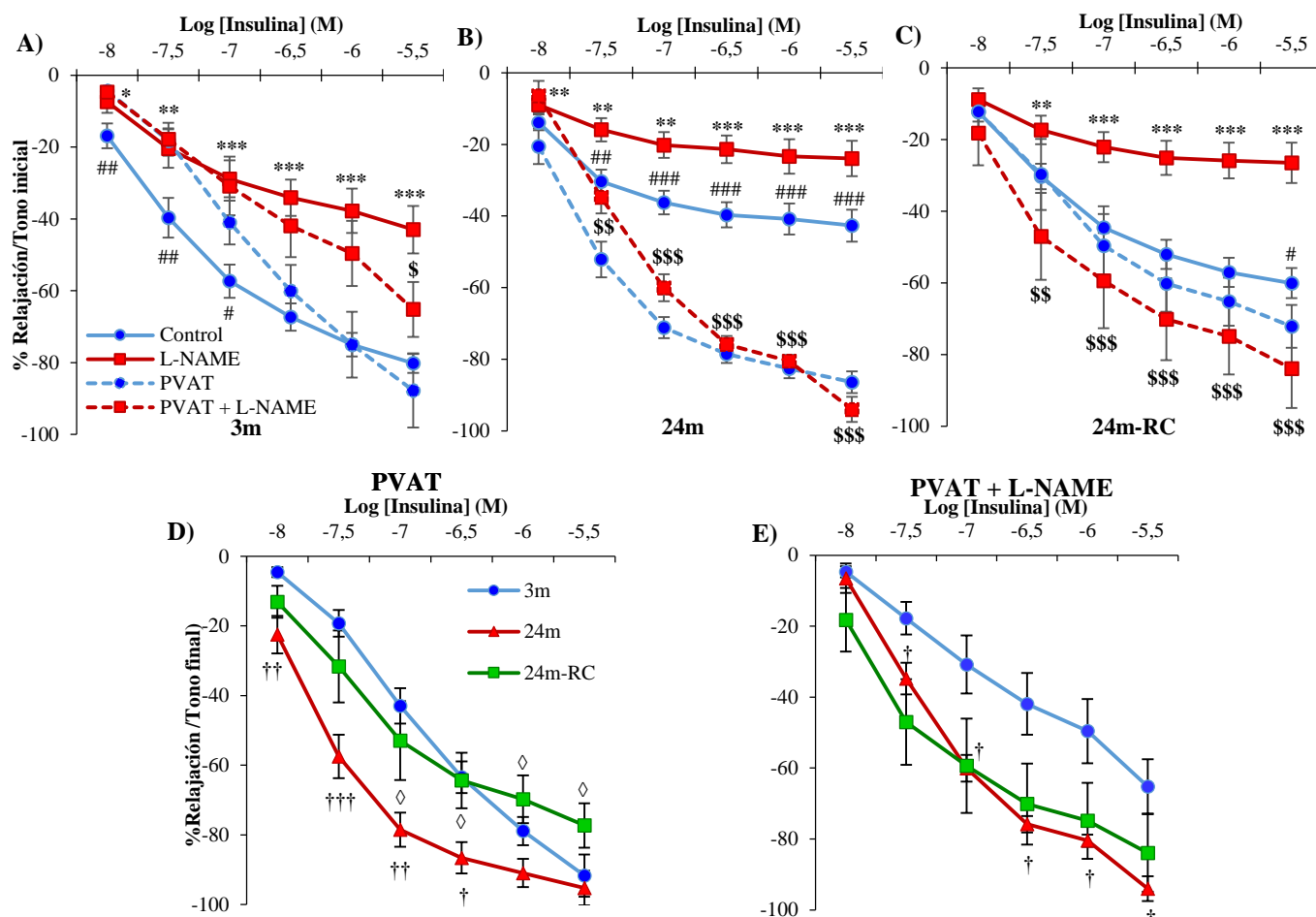
Por otro lado, la presencia de PVAT en los segmentos de aorta de las ratas de 24m aumentó significativamente la relajación en respuesta a la insulina a las dosis de $10^{-7.5}$ ($P<0.01$) y 10^{-7} - $10^{-5.5}$ M ($P<0.001$) frente a los segmentos control (Figura 35.B). La preincubación con L-NAME en los segmentos con PVAT produjo un aumento de la relajación en respuesta a la insulina a las dosis de $10^{-7.5}$ ($P<0.01$) y 10^{-7} - $10^{-5.5}$ M ($P<0.001$).

Por último, la presencia de PVAT alrededor de la aorta, produjo un aumento de la relajación en respuesta a la insulina a la dosis de $10^{-5.5}$ M ($P<0.05$) en comparación con los segmentos de aorta control (Figura 35.C). Además, los segmentos de aorta con PVAT y L-NAME (PVAT+L-NAME) aumentaron significativamente la relajación en respuesta a la insulina a las dosis de $10^{-7.5}$ ($P<0.01$) y 10^{-7} - $10^{-5.5}$ M ($P<0.001$) frente a los segmentos controles preincubados con L-NAME.

Cuando comparamos la respuesta a la insulina en presencia de PVAT alrededor de la aorta entre los distintos grupos experimentales, observamos que la relajación en respuesta a la insulina fue significativamente mayor en los segmentos de aorta de las ratas de 24m a las dosis de 10^{-8} ($P<0.01$), $10^{-7.5}$ ($P<0.001$), 10^{-7} ($P<0.01$), $10^{-6.5}$ ($P<0.05$) respecto a los segmentos de las ratas de 3m (Figura 35.D), lo que se acompañó de una disminución en el LogCE_{50} ($P<0.01$). La RC redujo significativamente la relajación en respuesta a la insulina inducida por el envejecimiento a las dosis de 10^{-7} - $10^{-5.5}$ M ($P<0.05$).

Por último, la preincubación con L-NAME de los segmentos de aorta rodeados con PVAT aumentó significativamente la relajación en respuesta a insulina a las dosis de 10^{-7} - $10^{-5.5}$ M

($P < 0.05$) y disminuyó el LogCE_{50} ($P < 0.05$) en las ratas de 24m respecto a los segmentos de aorta de 3m (Figura 35.E). La RC no produjo cambios significativos en la relajación en respuesta a la insulina.



LogCE_{50}	Control	L-NAME	PVAT	PVAT + L-NAME
3m	$-7,25 \pm 0,08$	$-7,05 \pm 0,10 *$	$-6,88 \pm 0,10 **$	$-6,81 \pm 0,00 \$$
24m	$-7,49 \pm 0,06$	$-7,46 \pm 0,09$	$-7,39 \pm 0,09 ††$	$-7,19 \pm 0,09 †$
24m-RC	$-7,22 \pm 0,07$	$-7,35 \pm 0,11$	$-7,20 \pm 0,14$	$-7,25 \pm 0,2$

Figura 35. Relajación de segmentos de arteria aorta con PVAT o no procedentes de ratas de 3m ($n = 10$), ratas de 24m ($n = 5$) y ratas de 24m-RC ($n = 7$) en respuesta a una curva dosis-respuesta de insulina en presencia o ausencia de (L-NAME). Cada punto representa la media \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. su respectivo control; ** $P < 0.01$ vs. su respectivo control; *** $P < 0.001$ vs. su respectivo control. # $P < 0.05$ vs. su respectivo PVAT; ## $P < 0.01$ vs. su respectivo PVAT; ### $P < 0.001$ vs. su respectivo PVAT; \$ $P < 0.05$ vs. su respectivo L-NAME; \$\$ $P < 0.01$ vs. su respectivo L-NAME; \$\$\$ $P < 0.001$ vs. su respectivo L-NAME; † $P < 0.05$ vs. ratas de 3m; †† $P < 0.01$ vs. ratas de 3m; ††† $P < 0.001$ vs. ratas de 3m; ◇ $P < 0.05$ vs. ratas de 24m.

3.2.2.3. Liberación de NO₂ + NO₃ en respuesta a la insulina y al PVAT

La liberación de NO₂ + NO₃ en respuesta a la insulina (10⁻⁷ M) en segmentos de aorta con y sin PVAT se muestra en la Figura 36. El envejecimiento disminuyó la liberación de NO₂ + NO₃ en respuesta a la insulina respecto a los segmentos de las ratas de 3m (P<0.05). La presencia de PVAT en los segmentos de aorta de rata indujo un incremento de la liberación de NO₂ + NO₃ tanto en los segmentos de las ratas de 24m (P<0.05) como en los de las ratas de 24m-RC (P<0.05) pero no en los de las ratas de 3m.

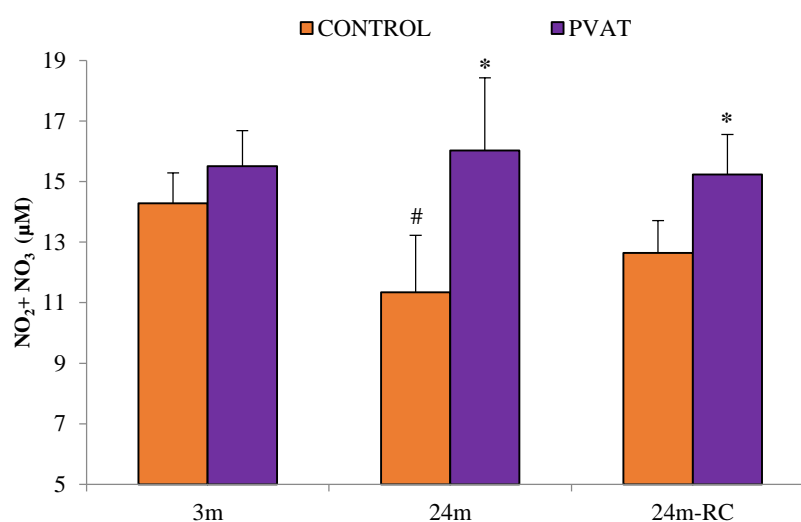


Figura 36. Liberación de NO₂ + NO₃ por segmentos de aorta con y sin PVAT de ratas de 3m (n = 24), ratas de 24m (n = 20) y ratas de 24m-RC (n = 25) preincubados con insulina (10⁻⁷ M). Las barras representan la media ± S.E.M. * P<0.05 vs. su respectivo control. # P<0.05 vs. ratas de 3m.

3.3. Células endoteliales

3.3.1. Liberación de NO₂ + NO₃ en respuesta a la insulina

La liberación de NO₂ + NO₃ (μM) en condiciones basales y en respuesta a la estimulación de las células endoteliales con insulina (10⁻⁷ M) se representa en la Figura 37. En condiciones basales, el envejecimiento cursó con un incremento significativo de la liberación de NO₂ + NO₃ por las células endoteliales de ratas de 24m en comparación con las de 3m (P<0.05). La insulina aumentó de forma significativa la liberación de NO₂ + NO₃ al medio de cultivo por parte de las

células endoteliales procedentes de ratas de 3m ($P<0.01$) y de ratas de 24m-RC ($P<0.05$) pero no en las ratas de 24m.

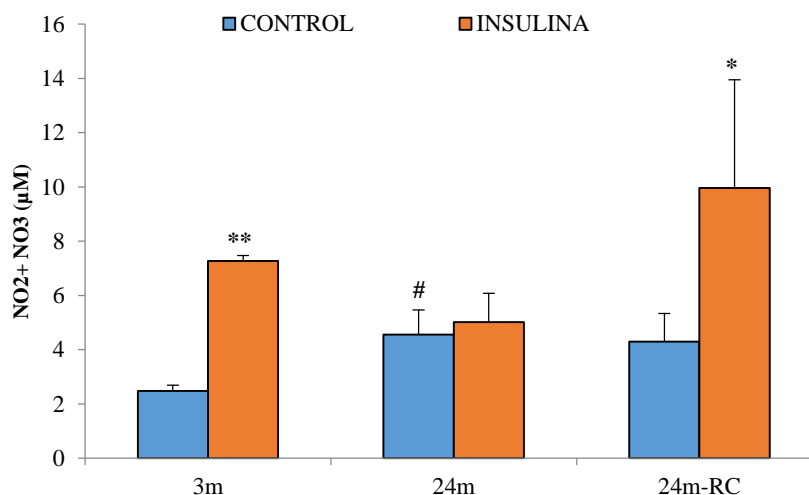


Figura 37. Liberación de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ por las células endoteliales de ratas de 3m ($n = 24$), ratas de 24m ($n = 20$) y ratas de 24m-RC ($n = 25$) preincubadas o no con insulina (10^{-7} M). Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P<0.05$ vs. su respectivo control; ** $P<0.01$ vs. su respectivo control. # $P<0.05$ vs. ratas de 3m.

3.3.2. Activación de las vías de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK en respuesta a la insulina

En la Figura 38 se representa la relación proteica de p-Akt/Ak (A), p-MAPK/MAPK (B) y el ratio Akt/MAPK (C) en cultivos primarios de células endoteliales procedentes de ratas de 3m, 24m y 24m-RC preincubadas o no con insulina (10^{-7} M).

Basalmente, ni la edad ni la RC produjeron diferencias significativas en las relaciones proteicas p-Akt/Ak, p-MAPK/MAPK y Akt/MAPK.

En respuesta a la insulina, la relación p-Akt/Ak aumentó significativamente tanto en las células endoteliales de las ratas de 3m ($P<0.01$) como en las de las ratas de 24m ($P<0.05$) y 24m-RC ($P<0.05$). Además, también aumentó el ratio p-MAPK/MAPK en las células endoteliales de las ratas de 24m ($P<0.05$) pero no en las ratas de 3m ni en las de 24m-RC. Por último, la incubación de las células endoteliales con insulina aumentó significativamente la

relación Akt/MAPK en las ratas de 3m ($P<0.01$) y en las ratas de 24m-RC ($P<0.05$), pero no en las células procedentes de las ratas de 24m.

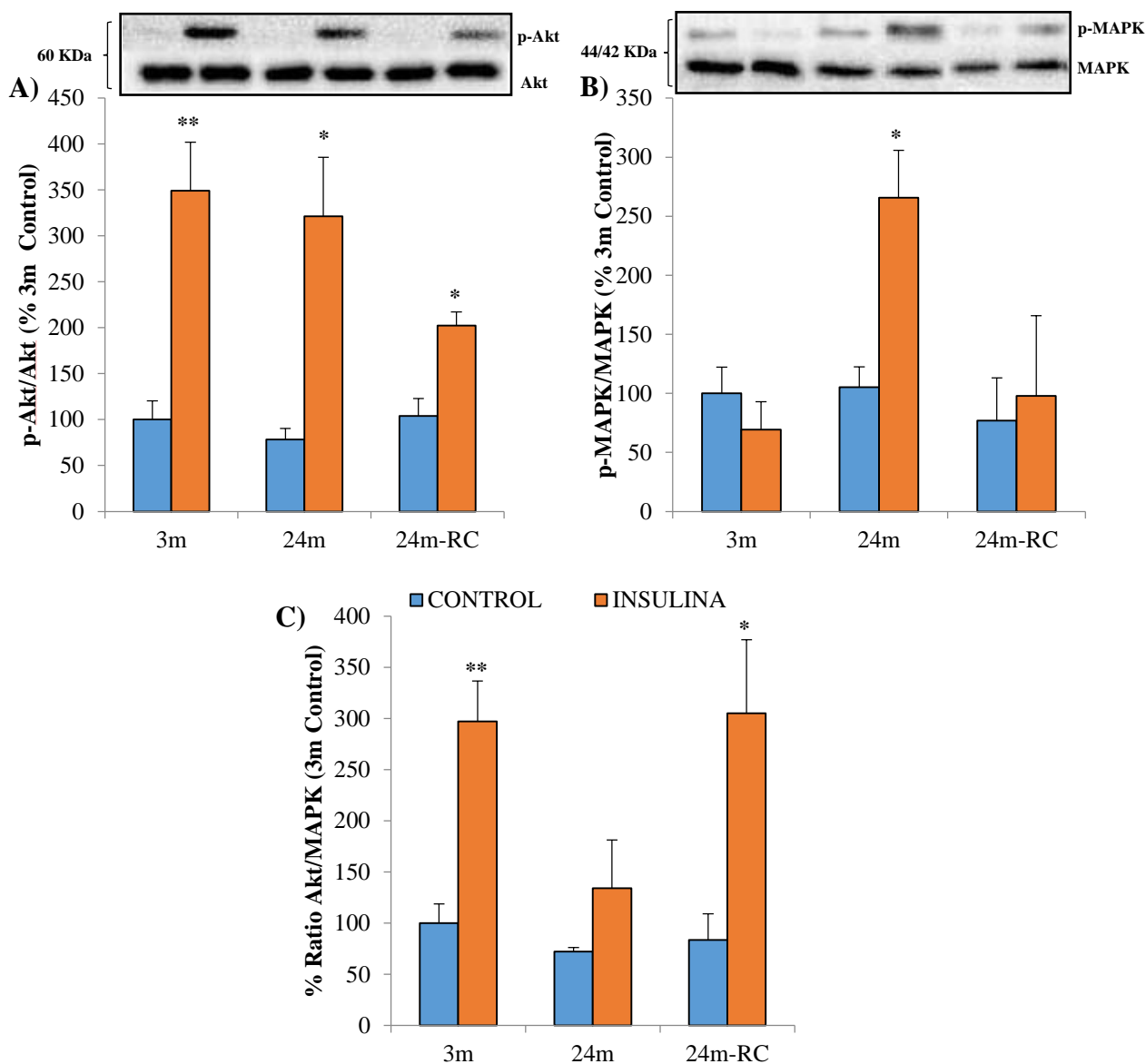


Figura 38. Niveles proteicos de Akt y MAPK en células endoteliales de ratas de 3m ($n = 8$), ratas de 24m ($n = 8$) y ratas de 24m-RC ($n = 8$) preincubados o no con insulina 10^{-7} M. **A.** Relación entre Akt fosforilado y el contenido total de Akt. **B.** Relación entre MAPK fosforilado y el contenido total de MAPK. **C.** Relación entre el ratio de Akt y el ratio de MAPK. Las barras representan la media \pm S.E.M. * $P<0.05$ vs. su respectivo control; ** $P<0.01$ vs. su respectivo control.

3.3.3. Expresión génica de eNOS e IR en respuesta a la insulina

La expresión génica de la eNOS (A) y del IR (B) en células endoteliales de ratas de 3m, 24m y de 24m-RC preincubadas o no con insulina 10^{-7} M se muestra en la Figura 39. No se

encontraron diferencias significativas en la expresión de la eNOS y del IR entre las células endoteliales procedentes de ninguno de los grupos experimentales.

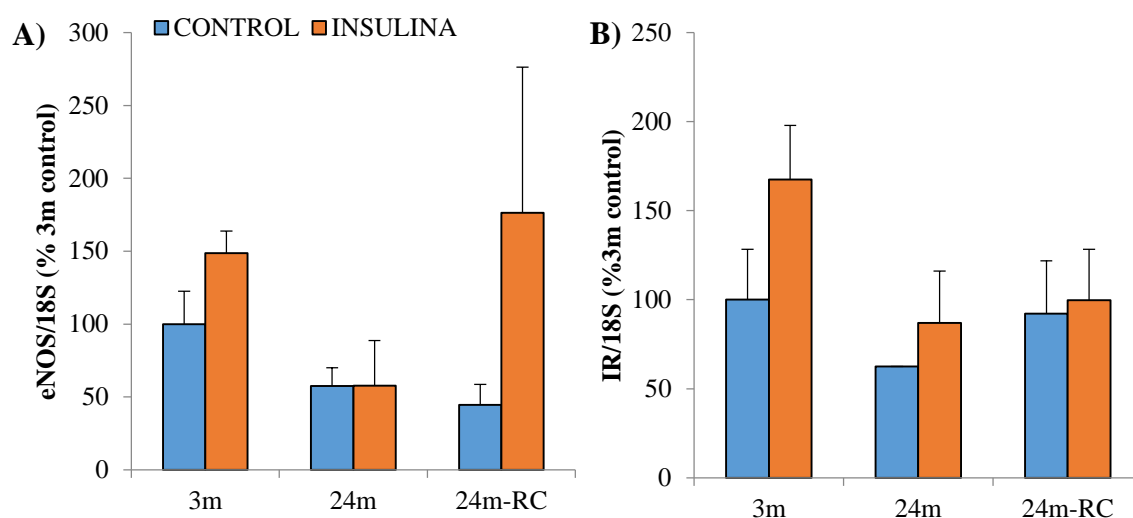


Figura 39. Expresión génica de eNOS (A) y del IR (B) en células endoteliales de ratas de 3m (n = 4), 24m (n = 4) y 24m-RC (n = 4) incubadas o no con insulina 10^{-7} M. Las barras representan la media \pm S.E.M.*

DISCUSIÓN

En este trabajo se describen los efectos del envejecimiento y la RC sobre dos aspectos de la función cardiovascular como son la respuesta al péptido vasoconstrictor ET-1 y a la hormona insulina. El estudio es pertinente ya que numerosos estudios en la literatura han demostrado que con la edad hay un deterioro progresivo de la función cardiovascular, que es la base de la elevada mortalidad por eventos cardiovasculares entre los pacientes de edad avanzada. Asimismo, la RC se ha propuesto como una de las estrategias que podría revertir y/o prevenir las alteraciones cardiovasculares producidas por el envejecimiento es la RC (Horrillo, Sierra et al. 2011).

1. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC EN LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y EL PERFIL METABÓLICO

Nuestros resultados muestran que las ratas de 24m tienen un mayor peso corporal y una mayor cantidad de grasa visceral y subcutánea que las ratas de 3m. Por el contrario, el envejecimiento cursa con una disminución significativa del peso del gastrocnemio y del corazón. La pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento, denominada sarcopenia, es debida tanto a un aumento de la apoptosis como de la proteólisis de las fibras musculares (Agarwal and Sohal 1994, Boyle, Shih et al. 2011). El aumento del tejido adiposo asociado al envejecimiento es debido tanto a una hipertrofia de los adipocitos (Sertié, Caminhotto et al. 2015) como la desregulación del metabolismo lipídico en los adipocitos subcutáneos, lo que provoca que los NEFAs liberados por los adipocitos se acumulen en otros tejidos como el tejido adiposo visceral y en tejidos no adiposos, como el músculo esquelético y cardíaco, el hígado y el páncreas (Després and Lemieux 2006, Rossi, Fantin et al. 2011).

Diversos estudios publicados con anterioridad apuntan que la RC es una estrategia útil para revertir este perfil metabólico (Coker, Miller et al. 2012, De Solís, Fernández-Agulló et al. 2012). Nuestros resultados avalan los previamente descritos en la literatura, ya que una RC del 20% de la ingesta diaria durante los 3 últimos meses de vida disminuye de manera significativa el peso del

tejido adiposo (visceral y subcutáneo) e incrementa el peso del corazón y el gastrocnemio (Coker, Miller et al. 2012, Sierra Rojas, García-San Frutos et al. 2016).

Respecto al perfil lipídico, nuestros resultados muestran que el envejecimiento cursa con un aumento en la concentración sérica de triglicéridos lo que concuerda con lo previamente descrito en la literatura tanto en animales de experimentación (Murawski, Kriesten et al. 1989) como en seres humanos (Greenfield, Kraemer et al. 1980). Por el contrario, los niveles séricos de triglicéridos en las ratas 24m-RC fueron significativamente más bajos que en las ratas 24m. Igualmente, la aplicación de un protocolo de RC a ratas de diferentes edades se asoció con una disminución en los niveles plasmáticos de triglicéridos y previno algunas alteraciones asociadas a la edad como la pérdida de la capacidad de respuesta lipolítica de los adipocitos al glucagón y las catecolaminas (Masoro, Bertrand et al. 1979) y la pérdida de la función de la masa muscular (Liepa, Masoro et al. 1980).

Además del aumento en los niveles séricos de triglicéridos el envejecimiento también se asocia con una elevación en los niveles de colesterol (Abbott, Garrison et al. 1983, Mc Auley and Mooney 2014), lo que tiene un impacto significativo en el riesgo de enfermedad cardiovascular (Gould, Davies et al. 2007). Nuestros datos coinciden con los publicados por Carlson et al., en los que los niveles séricos de colesterol estaban significativamente aumentados en ratas macho *Sprague-Dawley* (SD) de 24 semanas de edad (Carlson, Fr"o et al. 1968). Sin embargo, el protocolo de RC utilizado en este estudio no modificó las concentraciones séricas de colesterol en las ratas de 24m. Por el contrario, otros autores observaron que una RC del 50% de la ingesta diaria a lo largo de la vida reduce considerablemente los niveles séricos de colesterol en ratas de edad avanzada (Cirilo, Schoffen et al. 2013). Por tanto, estos resultados parecen indicar que la intervención dietética utilizada en nuestro estudio no es lo suficientemente efectiva como para disminuir los niveles séricos de colesterol.

Los NEFA son ácidos grasos libres que son liberados de las reservas de triglicéridos de los adipocitos por lipólisis y de fosfolípidos por la acción de las fosfolipasas (Mozaffarian 2007). La

liberación, así como la absorción de NEFAs circulantes por tejidos tales como el músculo esquelético y el hígado, está regulada por la acción de la insulina y modulada por la actividad adrenérgica (Mozaffarian 2007). Los niveles elevados de NEFAs en el plasma son una característica común del envejecimiento tanto en humanos como en roedores (Bonadonna, Groop et al. 1994, Tessari 2000) y se asocian con la disminución del transporte de glucosa en el músculo esquelético (Yu, Chen et al. 2002) y, por lo tanto, con resistencia a la insulina (Gao, Zhang et al. 2004). En este sentido, se ha demostrado que la elevación aguda de los NEFAs puede disminuir la sensibilidad a la insulina (Hawkins, Barzilai et al. 1997, Xiao, Giacca et al. 2009) induciendo la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo (Krogh-Madsen, Plomgaard et al. 2008). En nuestro estudio, en contra de lo esperado, hemos observado que el envejecimiento cursa con una disminución de los niveles séricos de NEFAs. Igualmente, Escriba et al., encontraron una disminución en los niveles de estos ácidos grasos en un estudio realizado en ratas. Estos menores niveles de NEFAs (Escriba, Agote et al. 1997) podrían atribuirse a una mayor utilización de ácidos grasos hepáticos para la síntesis de triglicéridos (Murthy, Oredipe et al. 1986). En nuestro estudio, la RC disminuyó los niveles séricos de NEFAs, probablemente debido a la disminución de la masa grasa y a la mejora del estado inflamatorio, lo que podría estar relacionado con la mejora de la sensibilidad a la insulina, tal y como se ha descrito previamente (Horrillo, Sierra et al. 2011).

2. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC SOBRE LA FUNCIÓN CARDÍACA

Para valorar los efectos del envejecimiento y de la RC sobre la función cardíaca hemos analizado la presión de perfusión de las arterias coronarias, la contractilidad del miocardio y la frecuencia cardíaca mediante la técnica del corazón perfundido (*Langendorff*) en corazones de ratas de 3m, 24m y 24-RC.

En condiciones basales, no se encontraron diferencias significativas en la presión de perfusión de las arterias coronarias entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, las ratas de 24m presentaron un aumento de la presión intraventricular y una disminución de la frecuencia cardíaca

respecto a las ratas de 3m. La disminución de la frecuencia cardíaca en las ratas de 24m podría deberse, al menos en parte, a la disminución en el número de células marcapasos en el nódulo sinoauricular (Lakatta 1993), tal y como se ha descrito previamente (Ferrari, Radaelli et al. 2003), lo que podría justificar el incremento de la presión intraventricular ya que al aumentar la duración del ciclo cardíaco al corazón le daría más tiempo a incrementar la presión intraventricular en cada latido. El aumento de la presión intraventricular podría asociarse también a la rigidez vascular asociada al envejecimiento (Lee and Oh 2010) que induce un incremento de la carga del ventrículo izquierdo (postcarga), lo que a largo plazo puede derivar en hipertrofia ventricular (London, Covic et al. 2011), y aumentar el riesgo de ECV (Safar, Chahwakilian et al. 2006).

En las ratas sometidas a RC estos parámetros funcionales no diferían de los de las ratas de 24m, al igual que observaron AlGhatrif et al., que describieron que 4 semanas de RC en ratones de 7 meses no modificaba la función cardíaca (AlGhatrif, Watts et al. 2013). Del mismo modo, tanto la RC durante 30-35 semanas en ratones utilizada en el estudio de Taffet et al., (Taffet, Pham et al. 1997), como la RC del 40% durante 22 meses en ratas Fischer344 llevada a cabo en el trabajo de Shinmura et al., (Shinmura, Tamaki et al. 2011) no alteraron la disminución de la función sistólica del ventrículo izquierdo ni la disminución del relleno diastólico temprano asociados al envejecimiento.

3. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC SOBRE LA FUNCIÓN CARDÍACA EN RESPUESTA A LA ET-1

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el envejecimiento cursa con alteraciones vasculares que se caracterizan por una disminución en la respuesta a sustancias vasodilatadoras como el NO y un aumento en la respuesta a sustancias vasoconstrictoras como la ET-1 (Donato, Lesniewski et al. 2005, Shipley and Muller-Delp 2005). No obstante, en contra de lo esperado, nuestros resultados muestran que la vasoconstricción de las arterias coronarias en respuesta a la ET-1 fue menor en las ratas de 24m respecto a las de 3m. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Shipley y

Muller en arterias coronarias aisladas de ratas (Shipley and Muller-Delp 2005) donde observaron que la disminución en la vasoconstricción coronaria en respuesta a la ET-1 se debía a un incremento en la liberación basal de NO desde el endotelio debido a un aumento en la expresión de la eNOS. En nuestro estudio, la expresión de la eNOS estaba disminuida en el corazón de las ratas de 24m, por lo que esta enzima no parece estar implicada en la disminución de la vasoconstricción coronaria en respuesta a la ET-1 en las ratas de 24m. Sin embargo, nuestros resultados mostraron un aumento en la expresión génica de la iNOS en el miocardio de las ratas de 24m en comparación con las ratas de 3m. La iNOS, que basalmente está continuamente activa, se expresa principalmente en los macrófagos (Wilcox, Subramanian et al. 1997) y su expresión aumenta en respuesta a citoquinas inflamatorias como el TNF- α (Nathan and Xie 1994). En nuestro estudio, la expresión del TNF- α está aumentada en el corazón de las ratas de 24m lo que podría estar relacionado con el aumento en la expresión de la iNOS. Es posible, por tanto, que el NO producido por la iNOS difunda hasta las arterias coronarias donde podría disminuir la vasoconstricción coronaria en respuesta a la ET-1 en las ratas de 24m.

Por otro lado, se ha descrito que el envejecimiento cursa con un aumento de la senescencia de las células endoteliales (Csiszar, Ungvari et al. 2004) por una disminución de la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1), lo que también podría disminuir la sensibilidad a sustancias vasoactivas como la ET-1.

Los cambios en la vasoconstricción coronaria en respuesta a la ET-1 fueron atenuados por la RC manteniéndose, sin embargo, elevadas tanto la expresión génica de la iNOS como del TNF- α en el tejido cardíaco. Estos resultados indicarían que el aumento en la respuesta vasoconstrictora de la ET-1 en las arterias coronarias de las ratas de 24m-RC no estaría mediado por una disminución del NO procedente de la iNOS sino por otros mecanismos, entre los que podría encontrarse un aumento en la expresión de SIRT1 en la vasculatura (Rippe, Lesniewski et al. 2010). Es posible, por tanto, que el aumento en la expresión de SIRT-1 en respuesta a la RC disminuya el número de células endoteliales senescentes, aumentando de esta manera la sensibilidad del endotelio a las sustancias vasoactivas como la ET-1.

En cuanto a la contractilidad miocárdica, medida por los cambios en el dP/dt , observamos que la ET-1 tiene un efecto bifásico. A concentraciones suprafisiológicas, la ET-1 redujo el dP/dt en todos los grupos experimentales, este efecto se debe probablemente a la disminución de la perfusión miocárdica provocada por la fuerte vasoconstricción coronaria producida por la ET-1 a elevadas concentraciones (Clozel and Clozel 1989), lo cual podría producir cierto grado de isquemia que se traduciría en una disminución de la contractilidad. Por el contrario, concentraciones bajas de ET-1 aumentaron la contractilidad miocárdica en los tres grupos experimentales, siendo este aumento de la contractilidad superior en las ratas de 24m que en las ratas de 3m y 24m-RC. El aumento en la contractilidad del miocardio en respuesta a la ET-1 (Ishikawa, Yanagisawa et al. 1988) se ha descrito en diferentes especies animales como las ratas (Krämer, Smith et al. 1991), los conejos (Takanashi and Endoh 1991), los hurones (Wang, Paik et al. 1991) y los seres humanos. Se ha demostrado que en los seres humanos el efecto inotrópico positivo de la ET-1 está mediado por la activación de receptores de ET-1 del subtipo ET_A (Pieske, Beyermann et al. 1999) ya que la infusión de un antagonista de ET_A indujo una reducción significativa de la contractilidad miocárdica (Kaumann, Bartel et al. 1999). El efecto de la activación del receptor subtipo ET_B sobre la contractilidad miocárdica ha sido menos estudiado, pero hay evidencias de que este receptor podría tener efectos inotrópicos negativos (Piuholo, M\^a et al. 2003, Leite-Moreira and Brás-Silva 2004). Aunque nuestros resultados indican que la expresión de los receptores ET_A en el corazón no se modifica en ningún grupo experimental, la expresión génica de los receptores ET_B disminuye con la edad, y aumenta significativamente con la RC, siendo la expresión de este receptor en las ratas de 24m-RC similar a la de las ratas de 3m. Es posible, por tanto, que en los corazones de las ratas de 3m y 24m-RC, los efectos de ET_A y ET_B se anulen entre sí, mientras que en las ratas de 24m la expresión reducida de receptores ET_B permita que el efecto inotrópico positivo de los receptores ET_A predomine.

Para determinar si los cambios en la contractilidad miocárdica en respuesta a la ET-1 estaban mediados por cambios en la expresión de ET-1 se analizó su expresión génica en el tejido cardíaco

ya que se ha descrito que la ET-1 puede ser producida localmente en el corazón en células endoteliales coronarias/miocárdicas y actuar como una sustancia paracrina (Oie, Vinge et al. 1997, Chen, Evans et al. 2000, Yamamoto, Masuyama et al. 2000). Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión de ET-1 en el corazón de las ratas de 24m que no se modificaba en respuesta a la RC. Igualmente otros autores han encontrado niveles aumentados de ET-1 en corazones de ratas de edad avanzada (Iemitsu, Miyauchi et al. 2002). Sin embargo, no existen estudios en la literatura en los que se haya medido la expresión génica de ET-1 en respuesta a la RC. En nuestra opinión, nuestros resultados sugieren que los niveles aumentados de ET-1 en el corazón de las ratas de 24m podrían tener un efecto paracrino sobre los cardiomiocitos y contribuir a algunas de las alteraciones cardíacas asociadas a la edad.

El último parámetro cardíaco analizado en nuestro estudio en respuesta a la ET-1 es el cambio de la frecuencia cardíaca. Nuestros resultados muestran que la frecuencia cardíaca en respuesta a la ET-1 aumenta con la edad y se restablece con la RC a valores similares a los de las ratas de 3m. Este efecto cronotrópico positivo de la ET-1 en las ratas de 24m sólo se observó a dosis altas de ET-1 (10^{-8} y 10^{-7} M), lo que podría estar relacionado con la baja frecuencia cardíaca basal de estos animales. Aunque se ha descrito que la ET-1 aumenta la frecuencia cardíaca (Ishikawa, Yanagisawa et al. 1988), no está del todo claro el tipo de receptor implicado en dicha acción. En este sentido, se ha descrito que la infusión del antagonista del receptor ET_B BQ-788 en ratas *Wistar* tiene un efecto cronotrópico positivo (Arıcı, Buyukdeligoz et al. 2013) mientras que la infusión de Bosentan (antagonista dual de ET_A y ET_B) no produce cambios en la frecuencia cardíaca (Kolettis, Baltogiannis et al. 2008). En base a estos resultados previos, y dado que la expresión génica de ET_B está aumentada en los corazones de las ratas de 24m-RC, es posible que el restablecimiento de la frecuencia cardíaca observado en las ratas de 24m-RC se deba al aumento del número de receptores ET_B en el corazón., lo que contrarrestaría los efectos cronotrópicos positivos de la ET-1 observados en las ratas de 24m.

4. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES PROINFLAMATORIOS Y PROFIBRÓTICOS EN EL MIOCARDIO

El envejecimiento se asocia con inflamación en diferentes órganos y tejidos incluyendo el sistema cardiovascular (Michaud, Balardy et al. 2013). En este estudio, aunque la expresión génica de algunos marcadores inflamatorios como la COX-2, IL-6, o IL-1 β y del marcador profibrótico TGF- β 1 no se modificó en respuesta al envejecimiento en el corazón, sí encontramos una sobreexpresión de la iNOS y del TNF- α en el tejido miocárdico de las ratas de 24m de edad. Igualmente, se ha encontrado que la expresión de ambos factores aumenta tanto en el corazón (Han, Turdi et al. 2012) como en las arterias coronarias (Csiszar, Ungvari et al. 2003) de ratas de avanzada edad lo que indica que el envejecimiento cursa con un estado de inflamación leve en estos tejidos. Sin embargo, aunque se ha descrito que la RC reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias (Sherman, Frumin et al. 2011), nuestros resultados muestran que el protocolo de RC utilizado en este estudio no disminuye la expresión de citoquinas y mediadores inflamatorios en el tejido cardíaco de las ratas de 24m. Igualmente, este mismo protocolo de RC no previno el aumento en la expresión de TNF- α inducida por el envejecimiento en otros tejidos como el hígado o el tejido adiposo (Horrillo, Sierra et al. 2011), lo que podría explicarse por la pequeña reducción en la ingesta calórica (20%) o la corta duración de la RC (3 meses). De hecho, un protocolo más prolongado de RC (10% durante 9 meses) o una reducción más severa en la ingesta de alimentos (40% durante 10 días) disminuyó significativamente la expresión de varios genes implicados en inflamación tanto en suero (Spaulding, Walford et al. 1997), como en el tejido adiposo (Higami, Barger et al. 2006) y renal (Jung, Lee et al. 2009) de animales de edad avanzada.

Igualmente, aunque muchos trabajos demuestran que el envejecimiento cursa con un incremento en la expresión génica del marcador profibrótico TGF- β 1 (Cai, Yuan et al. 2012), en nuestro estudio la expresión de este marcador en el corazón no difiere en los distintos grupos experimentales. Del mismo modo, otros autores han descrito que ni la edad (Annoni, Luvarà et al. 1998), ni la RC

(Stevanovic, Starcevic et al. 2012) modifican los niveles de expresión de este factor de crecimiento en el corazón.

5. EFECTOS DE LA EDAD Y LA RC EN LA RESPUESTA DE LAS ARTERIAS RENALES A LA ET-1

Además del deterioro de la función cardíaca, el envejecimiento cursa con alteraciones en la función renal que se deben, en gran parte, a cambios en la circulación renal (Lindeman 1990). Por este motivo en este estudio, hemos analizado los posibles efectos beneficiosos de un protocolo de RC moderado sobre las alteraciones en la circulación renal inducidas por el envejecimiento y específicamente en la respuesta de las arterias renales al péptido vasoconstrictor ET-1.

Nuestros resultados muestran que el envejecimiento cursa con un incremento en la respuesta contráctil a la ET-1 en las arterias renales que no se previene, e incluso se acentúa, en respuesta a la RC. De forma similar, se ha observado una respuesta contráctil mayor a ET-1 en ratas de edad avanzada tanto en arterias renales (Seo and Lüscher 1995, Meyer, Barton et al. 2014) como en otros lechos vasculares como la aorta (Rubio, Baños et al. 2006, Zanetti, Gortan Cappellari et al. 2010, Meyer, Barton et al. 2014) o las arteriolas de los músculos esqueléticos (Donato, Lesniewski et al. 2005). La mayor contracción a ET-1 en segmentos de arteria renal de ratas de 24m no parece estar mediada por una mayor síntesis de ET-1 en el tejido arterial, ya que los niveles de ARNm de ET-1 no se modificaron entre los grupos experimentales. Sin embargo, otros autores han descrito un aumento de los niveles proteicos de ET-1 en arterias renales de ratas de avanzada edad (Goettsch, Lattmann et al. 2001). Estos datos contradictorios pueden deberse a la cuantificación de los niveles de ARNm vs la proteína o bien al uso de diferentes cepas de rata (*Wistar* vs *WKY*).

La respuesta contráctil a la ET-1 en segmentos de arterias renales se asoció con un aumento del LogCE₅₀ después del bloqueo de los receptores ET_A con BQ-123 en todos grupos experimentales, lo que pone de manifiesto la implicación de los receptores ET_A en la respuesta vasoconstrictora a la ET-1. Por el contrario, el bloqueo de los receptores ET_B con BQ-788 sólo resultó en un aumento

significativo del LogCE₅₀ en los segmentos de arterias renales procedentes de las ratas de 24m y 24m-RC. Estos datos indican que los receptores ET_B también estarían implicados en la respuesta contráctil a ET-1 en los segmentos de arterias renales procedentes de ratas de 24m, tal y como se ha descrito en otros lechos vasculares como las arteriolas coronarias aisladas (Leblanc, Chen et al. 2013). Igualmente, algunos autores han descrito que la respuesta vascular a la ET-1 en individuos de edad avanzada no sólo está mediada por ET_A, sino también por los receptores ET_B los cuales inducen contracción derivada de endotelio en ciertas condiciones, incluyendo el envejecimiento (Shah 2007, Vanhoutte and Tang 2008). Sin embargo, otros autores han publicado que los receptores ET_B no están implicados en el aumento de la contracción vascular en respuesta a ET-1, ni en las arterias coronarias de ratas de avanzada edad (Korzick, Muller-Delp et al. 2005) ni en el antebrazo de ancianos humanos (Van Guilder, Westby et al. 2007). Estos resultados opuestos podrían explicarse debido a los diferentes lechos vasculares y también debido a las diferentes especies (ratas vs seres humanos) o cepas de rata (*Wistar* vs *Fischer* 344).

El bloqueo de la NOS con L-NAME aumentó la respuesta contráctil de las arterias renales a la ET-1 en las ratas de 3m, lo que se acompañó de una disminución significativa del LogCE₅₀. Este resultado evidencia que el NO amortigua la vasoconstricción en respuesta a la ET-1 en las ratas de 3m. Por el contrario, en las ratas de 24m la preincubación con L-NAME no disminuyó el LogCE₅₀, aunque aumentó significativamente la respuesta contráctil de los segmentos arteriales a la ET-1 a altas concentraciones, posiblemente por la inhibición de la iNOS, que en este grupo se encuentra incrementada. En las arterias renales procedentes de las ratas de 24m-RC el bloqueo de la NOS no indujo ningún efecto, lo que concuerda con la menor expresión de la iNOS en las arterias renales de las ratas de este grupo experimental, al igual que observaron otros autores en aorta de rata (Zanetti, Gortan Cappellari et al. 2010).

La mayor respuesta a la ET-1 de los segmentos de arteria renal procedentes de las ratas de 24m-RC frente a los de ratas de 24m, podría deberse al incremento en los niveles proteicos del receptor ET_A en el tejido arterial. Sin embargo, los niveles proteicos del receptor ET_B disminuyeron

significativamente en las arterias renales de las ratas de 24m, independientemente de que hubieran estado sometidas o no a RC, lo que podría estar relacionado con una retroalimentación negativa en la expresión génica de este receptor debido al incremento en los niveles circulantes de ET-1 inducido por edad (Nyberg, Mortensen et al. 2013).

Es posible, por tanto, que el mayor efecto vasoconstrictor en respuesta a la ET-1 en las arterias renales de las ratas de 24m, se deba, al menos en parte, a la disminución en los receptores ET_B, mientras que en las ratas de 24m-RC la expresión aumentada de receptores ET_A y disminuida de la iNOS permitiría que el efecto vasoconstrictor de los receptores ET_A predominara, aumentando por tanto la respuesta vasoconstrictora. Sin embargo, dado que el análisis de los niveles proteicos tanto de ET_A como de ET_B se realizó en el vaso completo, no es posible evaluar con certeza la cantidad exacta de estos receptores en el músculo y en el endotelio.

En contra de lo esperado, los resultados obtenidos en las arterias coronarias y en las arterias renales en respuesta a la ET-1 en nuestro estudio son opuestos, ya que en las arterias coronarias el envejecimiento cursa con una menor respuesta vasoconstrictora en respuesta a la ET-1 siendo éste efecto revertido por la RC, mientras que en las arterias renales el envejecimiento cursa con una mayor respuesta contráctil en respuesta a la ET-1 y la RC no previene este efecto. Estas diferencias podrían explicarse, al menos en parte, debido a que la medida de la vasodilatación coronaria no se realizó en arterias coronarias aisladas, sino que éstas estaban unidas al tejido miocárdico. Aunque tanto las arterias renales como el tejido cardiaco tenían aumentada la expresión génica de la iNOS, es posible que la elevada expresión de la iNOS en el miocardio, al ser éste un tejido de mayor tamaño, genere mayores cantidades de NO que difundirían a las arterias coronarias enmascarando el efecto contráctil de la ET-1 en las ratas de avanzada edad. Además, mientras que en el tejido arterial renal se pudo medir la expresión de los receptores de ET-1 en las arterias coronarias no, de modo que no podemos atribuir estas diferencias a los receptores de ET-1. Por tanto, nuestros resultados sugieren que es necesario realizar más experimentos para dilucidar si estos resultados

contradictorios se deben a la diferencia en la expresión de los receptores de ET-1 o a que las arterias coronarias no fueron aisladas.

Respecto al efecto de la RC, los resultados también difieren entre las arterias renales y las coronarias ya que la RC no previene las alteraciones en la función vascular inducidas por el envejecimiento en las arterias renales pero sí en las coronarias. Sin embargo, no modificó la expresión génica de diferentes marcadores proinflamatorios y profibróticos en el corazón mientras que sí mostró efectos significativos en los niveles de ARNm de diferentes marcadores en las arterias renales. Estos cambios consistieron en una disminución de expresión del gen de la iNOS, un aumento de la expresión génica de la eNOS y del contenido proteico de los receptores ET_A. Igualmente, se ha descrito en la literatura que la RC previene la disfunción endotelial en segmentos de aorta de ratas de avanzada edad a través de una disminución de la expresión génica de la iNOS (Zanetti, Gortan Cappellari et al. 2010). Además, en el estudio realizado por Zanetti et al., también encontraron una mejoría en la función vascular en ratas viejas sometidas a RC probablemente debido a una disminución del estrés oxidativo ya que, en este estudio, la RC redujo la producción de NO₂ + NO₃, y la formación de peroxinitrito y aumentó la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias en la respuesta a la ET-1 entre las ratas de 24m y las de 24m-RC. Estos resultados opuestos pueden explicarse por las diferencias en el protocolo de RC, por las diferencias en los lechos vasculares (arteria renal vs aorta), y también por las diferencias en la edad de las ratas jóvenes (3m vs 6m). Del mismo modo, los cambios morfológicos o bioquímicos no siempre se traducen en cambios funcionales, como ocurre con el tratamiento con ERAs (*Endothelin receptor antagonists*) en ratas de avanzada edad en las que la reducción de la glomerulosclerosis renal y la mejora de la ultraestructura de los podocitos no da lugar ni a una mejoría de la función renal ni a cambios en la presión sanguínea (Ortmann, Amann et al. 2004, Barton 2014).

6. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y LA RC SOBRE LA FUNCIÓN CARDÍACA EN RESPUESTA A LA INSULINA

En la segunda parte de este estudio se han analizado los efectos del envejecimiento y de la RC sobre la función cardíaca, estudiando la relajación de las arterias coronarias, la contractilidad del miocardio y la frecuencia cardíaca tanto en condiciones basales como en respuesta a la administración de dosis crecientes y acumulativas de insulina.

En cuanto a la respuesta de las arterias coronarias a la insulina, encontramos que en las ratas de 3m la insulina producía vasodilatación a bajas concentraciones y vasoconstricción a la concentración más alta estudiada (10^{-7} M). Igualmente, se ha descrito que la insulina induce relajación en diferentes lechos vasculares como las arterias mesentéricas (Mimaki, Kawasaki et al. 1998), pulmonares (Aye, Sheedy et al. 2003), renales (Molinari, Battaglia et al. 2001), cerebrales, (Olver, McDonald et al. 2017) coronarias (Katakam, Tulbert et al. 2005) y aorta (Subramaniam, Achike et al. 2009). Sin embargo, la insulina a dosis bajas no indujo vasodilatación en las arterias coronarias de las ratas de 24m, independientemente de si éstas habían estado o no sometidas a RC. Nuestros resultados concuerdan con los publicados previamente ya que se ha descrito que el envejecimiento cursa con resistencia vascular a la insulina (Cefalu 2001, Reaven 2004) mediada por una disminución de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt, manteniéndose inalteradas, sin embargo, las acciones proliferativas y vasoconstrictoras ligadas a la vía de señalización MAPK (Muniyappa, Montagnani et al. 2007).

Para determinar si los efectos de la insulina en el corazón de las ratas de los tres grupos experimentales estaban mediados por la activación de la vía PI3K/Akt, algunos corazones se preincubaron con Wortmanina, antagonista de la enzima PI3K, antes de la curva de insulina, observándose un bloqueo en la relajación de las arterias coronarias de las ratas de 3m en respuesta a la insulina. Se ha descrito que la activación de la vía de la PI3K/Akt media los efectos vasodilatadores de la insulina en aortas de ratas (Kobayashi, Taguchi et al. 2009, Wang, Tian et al.

2015) y arterias coronarias (Contreras, Sánchez et al. 2011), así como la liberación de NO en las células endoteliales (Montagnani, Chen et al. 2001).

La dosis más alta de insulina (10^{-7} M) produjo vasoconstricción en las arterias coronarias de las ratas de los tres grupos experimentales siendo esta vasoconstricción mayor en los corazones de las ratas de 24m que en los corazones de las ratas de 3m. Igualmente, otros autores han encontrado que la respuesta vasoconstrictora en respuesta a dosis altas de insulina (1.5×10^{-6} mol/l) en la arteria femoral de ratas SD aumenta con la edad (Li, Xiong et al. 2009), efecto que se atribuyó a la menor activación de la eNOS, lo que deriva en una menor producción de NO biodisponible para producir la relajación arterial (Li, Xiong et al. 2009). En nuestro estudio, la expresión basal de la eNOS fue mayor en los corazones de las ratas de 3m que en los corazones de las ratas de 24m, y aumentó en respuesta a la insulina en las ratas de 3m pero no en las de 24m. Estos resultados indican que en el corazón de las ratas de 3m la insulina tras la unión a su receptor activa la vía de la PI3K/Akt, dando lugar a la fosforilación y la consiguiente activación de la eNOS, generando un aumento de la producción y biodisponibilidad de NO que difundiría al músculo liso de las arterias coronarias produciendo su relajación. Sin embargo, en las ratas de 24m esta vía estaría menos activada lo que resultaría en una menor producción de NO en respuesta a la insulina.

La RC se ha propuesto como un procedimiento eficaz para prevenir algunas de las disfunciones vasculares y cardíacas asociadas con el envejecimiento (Weiss and Fontana 2011). Sin embargo, el protocolo de RC utilizado en nuestro estudio, no mejora la resistencia vascular a la insulina en las arterias coronarias inducida por el envejecimiento ni aumenta significativamente la expresión de la eNOS en el tejido miocárdico. Esto podría deberse a que nuestro protocolo de RC es muy leve como para producir una mejora en la resistencia a la insulina en las arterias coronarias. De hecho, en otro estudio en el que se realizó un protocolo de RC más severo (30-50% durante toda la vida desde el destete) en roedores y monos, se observó una mejora de la disfunción endotelial asociada a la edad y un aumento en la expresión de la eNOS (Ungvari, Parrado-Fernandez et al. 2008, Weiss and Fontana 2011). Es interesante, sin embargo, que el mismo protocolo de RC que el utilizado en

este estudio sí resulta eficaz para mejorar la resistencia a la insulina en otros tejidos como el tejido adiposo y el hipotálamo (García-San Frutos, Fernández-Agulló et al. 2012, Sierra Rojas, García-San Frutos et al. 2016). Es posible, por tanto, que los mecanismos implicados en la resistencia a insulina difieran en los distintos tejidos.

Respecto a los efectos de la insulina sobre la contractilidad cardíaca, nuestros resultados muestran un aumento significativo de la contractilidad en las ratas de 3m en respuesta a la insulina, tal y como reflejan el aumento en la presión intraventricular y el dP/dt . Estos resultados corroboran lo descrito por Stehr et al., (Stehr, Pexa et al. 2007) y en Ren et al., (Ren, Walsh et al. 1999), que observaron que la infusión de insulina en el corazón aislado tiene un efecto inotrópico positivo. Por el contrario, la contractilidad cardíaca en respuesta a la insulina fue menor en los corazones de las ratas de 24m con respecto a las de 3m. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, que observaron que la contractilidad cardíaca en respuesta a la insulina era menor en corazones aislados de ratas SD de 24 meses que en ratas de 6 meses de edad (Li, Xiong et al. 2009).

La RC revirtió la disminución de la presión intraventricular y la contractilidad cardíaca en respuesta a la insulina inducidas por el envejecimiento. El bloqueo de la vía PI3K/Akt en los corazones, previene el aumento de la contractilidad cardíaca inducido por la insulina tanto en las ratas de 3m como en las de 24m-RC, pero no en las ratas de 24m, lo que indica que el aumento de la contractilidad en respuesta a la insulina en estos dos grupos experimentales estaría mediado por la activación de esta vía. La vía PI3K/Akt está implicada en la regulación de la función contráctil del corazón, por lo que el deterioro de esta vía de señalización se considera un determinante importante de la función cardíaca (Condorelli, Drusco et al. 2002, Catalucci and Condorelli 2006). La activación de Akt aumenta la intensidad de corriente de Ca^{2+} en los cardiomiocitos (Catalucci and Condorelli 2006, Sun, Kerfant et al. 2006) y su inhibición la disminuye (Catalucci and Condorelli 2006, Sun, Kerfant et al. 2006), debido a que Akt juega un papel central en la regulación de la formación del complejo del canal de Ca^{2+} de tipo L (Catalucci, Zhang et al. 2009). Catalucci et al., observaron que cuando la subunidad $Ca_v\beta 2$ del complejo es fosforilada por Akt, se evita la

degradación de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1$ del canal de Ca^{2+} tipo L (Catalucci, Zhang et al. 2009), de modo que se produce un aumento de la intensidad de corriente de Ca^{2+} en los cardiomiocitos lo que, en última instancia, produce el incremento de la contractilidad cardíaca.

Con el objetivo de determinar la activación de las dos principales vías de señalización intracelular en respuesta a insulina, se cuantificaron los niveles proteicos de p-Akt/Akt y de p-MAPK/MAPK en los corazones de los tres grupos experimentales, tanto basalmente como en respuesta a la insulina y se calculó el ratio Akt/MAPK. Nuestros resultados muestran que en respuesta a la insulina predomina la activación de la vía PI3K/Akt en las ratas de 3m y 24m-RC frente a la vía MAPK, mientras que en las ratas de 24m hay una disminución de la activación de la vía PI3K/AKT. Por lo tanto, el envejecimiento cursa con alteraciones en la activación de las vías p-Akt/Akt y p-MAPK/MAPK en respuesta a la insulina en el corazón, produciendo una disminución de la contractilidad cardíaca por una reducción de la activación de la vía PI3K/Akt. Una RC leve podría ser una estrategia eficaz para mejorar la regulación funcional del canal de Ca^{2+} tipo L, contribuyendo así a una mejora en la función contráctil de los cardiomiocitos.

Para determinar si los cambios encontrados en la activación de las vías de señalización de la insulina se debían a alteraciones en el IR, cuantificamos la expresión génica del IR en condiciones basales y en respuesta a la insulina en los corazones de los tres grupos experimentales. Observamos que basalmente no hay cambios significativos entre los tres grupos experimentales, pero en respuesta a la insulina la expresión génica de este receptor aumentó en los corazones de las ratas de 3m, disminuyó en los de las ratas de 24m y no se vio modificada en los de las ratas de 24m-RC. Algunos autores han descrito que el envejecimiento produce una disminución de los niveles de expresión del IR en el corazón (Torlińska, Maćkowiak et al. 2000, Masternak, Al-Regaiey et al. 2006), y que estos IR tienen una menor afinidad por la insulina que los IR de los corazones de las ratas jóvenes (Torlińska, Maćkowiak et al. 2000). En cambio, una RC del 30% durante 19 meses en ratones revierte la disminución del IR en el corazón (Masternak, Al-Regaiey et al. 2006), efecto que no se observó en nuestro estudio. Estos resultados contradictorios observados en animales

sometidos a RC pueden deberse a diferencias en el uso de animales (ratones *vs* ratas), o diferencias tanto en la duración (19 meses *vs* 3 meses) como en la severidad de la RC (30% *vs* 20%).

Debido a que la expresión del transportador de glucosa GLUT-4 es el último paso en la cascada de señalización de la insulina, y puesto que hemos observado que tanto la expresión del IR como la activación de la vía PI3K/Akt en los corazones se ve modificada por el envejecimiento, cuantificamos la expresión génica del GLUT-4 en los corazones de las ratas de los tres grupos experimentales en condiciones basales y en respuesta a la insulina. El transportador GLUT-4 es el responsable de la captación de glucosa en adipocitos (Zorzano, Wilkinson et al. 1989) y cardiomiocitos (Jiang, Yu et al. 2016) en respuesta a la insulina. En el corazón se encuentra en su mayoría en el interior celular almacenado en vesículas a expensas de recibir una señal que lo transloque a la membrana plasmática y así realizar la captación de glucosa (Slot, Geuze et al. 1991). Nuestros resultados muestran que, en condiciones basales, la expresión del GLUT-4 estaba disminuida en los corazones de las ratas de 24m-RC en comparación con las ratas de 24m. Igualmente, varios estudios han demostrado que tanto el ayuno como la RC a corto o a largo plazo, cursan con una disminución en la expresión génica del GLUT-4 (Camps, Castelló et al. 1992, Wang, Bell-Farrow et al. 1997, Palou, Sánchez et al. 2010). Sin embargo, se ha demostrado que esta disminución no se traduce en un menor contenido proteico, sino que los niveles de este transportador se mantienen prácticamente constantes en comparación con los de los corazones de ratas alimentados *ad libitum* (Camps, Castelló et al. 1992).

La perfusión de los corazones con dosis crecientes de insulina aumentó la expresión del GLUT-4 en el tejido miocárdico de las ratas de 3m y 24m-RC, pero no en los corazones de las ratas de 24m. Estos resultados indicarían, por tanto, que la RC induce una mejora de la sensibilidad a la insulina en ratas de avanzada edad, tal y como han descrito otros autores en macacos (Kemnitz, Roecker et al. 1994) y en ratas (Cartee, Kietzke et al. 1994). Dado que la insulina aumenta la contractilidad cardíaca tanto *in vivo*, como en el músculo cardíaco aislado (Maier, Aulbach et al. 1999, Abel 2004, von Lewinski, Bruns et al. 2005) y puesto que el corazón, para mantener su función contráctil,

requiere un suministro continuo y abundante de energía (glucosa) (Taegtmeyer 1994), es lógico pensar que exista una íntima relación entre el IR y el GLUT-4 con la contractilidad cardiaca (McQueen, Zhang et al. 2005, Domenighetti, Danes et al. 2010). En este sentido, nuestros resultados muestran un incremento paralelo de la contractilidad cardiaca y del IR y el GLUT-4 en respuesta a la insulina en las ratas de 3m. Igualmente en las ratas de 24m la disminución del IR y la no modificación del GLUT-4 se tradujeron en una reducción de la contractilidad cardiaca en respuesta a la insulina. Por último, la RC aunque no modificó la expresión génica del IR, incrementó la expresión del GLUT-4 y la contractilidad cardiaca, de modo que, este aumento de la expresión génica del GLUT4 en el corazón de las ratas de 24m-RC podría favorecer la captación de glucosa por parte de los cardiomiocitos evitando así la disminución de la contractilidad en respuesta a la insulina asociada al envejecimiento (Capasso, Palackal et al. 1990).

7. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y LA RC SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR EN RESPUESTA A LA INSULINA

Para analizar el efecto del envejecimiento y la RC en la respuesta vascular a la insulina, en este trabajo hemos estudiado el efecto que ejerce la insulina en segmentos de aorta de ratas de 3m, de 24m y de 24m-RC.

La relajación de los segmentos de aorta en respuesta a la insulina fue menor en las ratas de 24m en comparación con las ratas de 3m. Estos resultados corroboran lo descrito por Schulman et al., (Schulman, Zhou et al. 2007) y por Li et al., (Li, Xiong et al. 2009), que observaron que los anillos de aorta torácica y abdominal de ratas SD de 24 meses de edad relajaban menos en respuesta a la insulina que los de ratas de 3 y 6 meses, lo que se asoció con una disminución de la activación (fosforilación) estimulada por insulina de Akt y de la eNOS.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la relajación de los segmentos de aorta procedentes de las ratas de 24m-RC en respuesta a la insulina fue mayor que la de los procedentes de las ratas de 24m. Este aumento de la relajación en las ratas de 24m-RC se anula mediante la

preincubación de los segmentos con L-NAME, lo que sugiere que la mayor vasodilatación en respuesta a la insulina en este grupo está mediada por el NO. Del mismo modo, otros autores han descrito que la mejora de la disfunción endotelial asociada al envejecimiento en ratas de 24 meses sometidas a una RC del 26% durante 3 semanas era consecuencia de una disminución en el balance iNOS/eNOS (Zanetti, Gortan Cappellari et al. 2010).

Para corroborar que la relajación de los segmentos de aorta de los tres grupos experimentales en respuesta a la insulina estaba relacionada con la disponibilidad de NO, cuantificamos la liberación de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ en segmentos de aorta incubados en presencia o ausencia de insulina. Los resultados muestran que, en condiciones basales, la producción de NO fue menor en los segmentos de aorta de las ratas de 24m, tal y como se ha descrito en la literatura (Celermajer, Sorensen et al. 1994, Kang, Reyes et al. 2009). En respuesta a la insulina, los segmentos de aorta de las ratas de 3m y 24m-RC incrementaron la liberación de NO, en cambio, los de las ratas de 24m la disminuyeron. La capacidad de la insulina para estimular la eNOS y aumentar la producción de NO está bien establecida (Hsueh and Law 1999). En este sentido, algunos autores como Hartell et al., encontraron un aumento en la liberación de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ en segmentos de aorta de rata y ratón tras ser estimulados con insulina 10^{-8} y 10^{-6} M (Hartell, Archer et al. 2005). Para valorar si el aumento en la liberación de NO encontrado en los segmentos de aorta de ratas de 3m y 24m-RC en respuesta a la insulina estaba mediado por un incremento de la eNOS, medimos tanto los niveles proteicos como la expresión génica de la eNOS basales y en respuesta a la insulina en los segmentos de aorta, como el balance proteico p-Akt/Akt y p-MAPK/MAPK en las mismas condiciones. Se sabe que la estimulación de la eNOS por Akt implica la fosforilación de un residuo de serina (Ser^{1179}) (Montagnani, Chen et al. 2001). De hecho, una mutación puntual en este residuo ($\text{Ser}^{1179\text{A}}$) previene la estimulación de la eNOS por Akt (Montagnani, Chen et al. 2001). En presencia de insulina, tanto la expresión génica como proteica de la eNOS aumenta en las aortas de las ratas de 3m, lo que se relaciona con un aumento en el ratio p-Akt/Akt. Sin embargo, la insulina no aumentó estos parámetros en las aortas de las ratas de 24m, tal y como se ha descrito previamente (Schulman,

Zhou et al. 2007). Respecto al efecto de la RC, nuestros resultados muestran un aumento en el ratio p-Akt/Akt basal en las aortas de las ratas de 24m-RC frente a las ratas de 24m, así como un incremento significativo en los ratios p-Akt/Akt y p-eNOS/eNOS en respuesta a la insulina. Del mismo modo, otros autores han descrito que una RC del 30% durante 2 meses en ratones de avanzada edad produce un aumento de la biodisponibilidad de NO por un incremento de los niveles proteicos de la eNOS en la arteria aorta (Rippe, Lesniewski et al. 2010).

Para determinar si los efectos vasculares en respuesta a la insulina eran específicos del endotelio, cuantificamos la producción de NO₂ + NO₃ basal y en presencia de insulina en cultivos primarios de células endoteliales procedentes de aortas de los animales de los tres grupos experimentales. En contra de lo esperado, la liberación de NO₂ + NO₃ aumentó basalmente en el medio de cultivo procedente de las células endoteliales de las ratas de 24m, efecto que no se acompañó de un aumento en la expresión de la eNOS. Por tanto, es posible que la mayor liberación de NO₂ + NO₃ en este grupo experimental se deba a la activación de la iNOS cuya expresión aumenta con el envejecimiento en células endoteliales (Csiszar, Ungvari et al. 2002), así como en la aorta (Chou, Yen et al. 1998) y en el corazón (Botta, Laher et al. 2013).

En respuesta a la insulina, aumentó la producción de NO tanto en las células endoteliales de las ratas de 3m como en las de las ratas de 24m-RC, mientras que las células endoteliales procedentes de las ratas de 24m no modificaron su producción de NO. Además, al analizar el ratio Akt/MAPK, encontramos que en las ratas de 3m y 24m-RC mayoritariamente se activa la vía PI3/Akt frente a la vía MAPK, efecto que no observamos en las células endoteliales de las ratas de 24m. Existen estudios en la literatura que describen que en respuesta a la insulina, las células endoteliales humanas aumentan la producción de NO (Zeng, Nystrom et al. 2000). Por tanto, nuestros resultados indican que las células endoteliales de las ratas de 24m tienen alterada la cascada de señalización de la insulina, encontrándose disminuida la activación de la vía PI3K/Akt, lo que da lugar, en última instancia, a una menor producción de NO, que se traduce en una menor vasodilatación de la aorta en respuesta a la insulina.

Puesto que la alteración en la vía de señalización de la insulina en el envejecimiento puede ocurrir a diferentes niveles, cuantificamos la expresión de los transportadores GLUT-4 en los segmentos de aorta y del IR en los segmentos de aorta y en las células endoteliales de las ratas de los tres grupos de experimentación en presencia o ausencia de insulina. La expresión del GLUT-4 no se determinó en el cultivo primario de células endoteliales puesto que está descrito que la captación de glucosa en estas células se lleva a cabo por GLUT-1 y no por GLUT-4 (Davey, Garlick et al. 2007). Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión del GLUT-4 y del IR en los segmentos de aorta de las ratas de 24m con respecto a las ratas de 3m que es atenuada por la RC en condiciones basales. Sin embargo, la estimulación con insulina aumentó la expresión génica del IR en la aorta de las ratas de 3m pero no modificó la expresión de estos genes en las ratas de 24m y 24m-RC.

Se ha descrito que la resistencia a la insulina asociada al envejecimiento se debe, al menos en parte, a cambios en la transducción de la señal del IR (Fulop, Larbi et al. 2003). Hasta el momento no existen estudios en los que se haya estudiado el efecto del envejecimiento sobre la expresión del IR ni en células endoteliales ni en vasos sanguíneos. Sin embargo, varios autores encontraron que el envejecimiento produce disminución de los niveles de expresión del IR en otros órganos como en el hígado, el musculo esquelético (Carvalho, Brenelli et al. 1996), el cerebro (Zaia and Piantanelli 2000) y el corazón (Torlińska, Maćkowiak et al. 2000, Masternak, Al-Regaiey et al. 2006) y que una RC del 30% revierte la disminución del IR en el corazón (Masternak, Al-Regaiey et al. 2006), así como en el hígado y músculo esquelético (Bonkowski, Dominici et al. 2009) Otros autores encontraron que el envejecimiento disminuye la expresión del GLUT-4 en aortas de ratas *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF) de avanzada edad (Minamiyama, Bito et al. 2007) y que una RC del 30% durante 3 meses incrementa su expresión en la aorta (Minamiyama, Bito et al. 2007). Estos resultados contradictorios observados en la expresión del GLUT-4 en animales sometidos a RC pueden deberse o bien al uso de diferentes cepas de rata (OLETF vs *Wistar*), o bien a diferencias en la severidad de la RC (30% vs 20%).

Además de las acciones vasodilatadoras de la insulina discutidas anteriormente, las acciones vasoconstrictoras de la insulina se producen a través de diferentes mecanismos entre los que se incluyen la activación del sistema nervioso simpático (Scherrer and Sartori 1997) y la estimulación de la producción del péptido vasoconstrictor ET-1 por el endotelio vascular (Vicent, Ilany et al. 2003). Nuestros resultados muestran que dosis elevadas de insulina ejercen un efecto vasoconstrictor en segmentos de aorta y que este efecto es más marcado en los segmentos de aorta procedentes de las ratas de 24m en comparación tanto con las ratas de 3m como con las de 24m-RC. La preincubación de algunos segmentos de aorta con Losartan (antagonista de los receptores de angiotensina 1), BQ-123 (antagonista del receptor de ET-1 tipo A (ET_A) y Furegrelato (inhibidor de la tromboxano sintasa) no bloqueó el aumento en la vasoconstricción en respuesta a la insulina en las ratas de 24m por lo que el mecanismo de acción por el cual se produce la vasoconstricción en la aorta en respuesta a dosis altas de insulina en el envejecimiento requiere de más estudio. Un candidato que podría estar implicado en dicho efecto sería la urotensina-II, un péptido vasoactivo producido en el endotelio que está asociado con la regulación del metabolismo de la glucosa (Clozel, Hess et al. 2006) y que produce vasodilatación mediada por el endotelio, pero en situaciones patológicas donde la función endotelial está dañada, como en la insuficiencia cardiaca (Lim, Honisett et al. 2004), la hipertensión (Sondermeijer, Kompa et al. 2005) y en la resistencia a la insulina (Ong, Wong et al. 2006) produce vasoconstricción (Douglas, Dhanak et al. 2004).

8. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y LA RC EN EL TEJIDO ADIPOSO PERIVASCULAR (PVAT)

Aunque inicialmente se consideró que la función del PVAT era exclusivamente proporcionar un soporte mecánico para la vasculatura, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que el PVAT juega un papel importante en la regulación de la función vascular/endotelial tanto fisiológica como patológicamente (Nosalski and Guzik 2017). En patologías asociadas con disfunción vascular el PVAT libera una serie de factores paracrinos, tales como adipoquinas, citoquinas y quimioquinas,

que pueden afectar directamente a las CMLV y endoteliales e iniciar procesos de inflamación vascular. Este desequilibrio entre la producción y liberación de factores protectores y moléculas proinflamatorias se ha denominado disfunción del PVAT (Guzik, Marvar et al. 2007).

Dado que el envejecimiento cursa con aumento de la adiposidad, por un incremento en el número y tamaño de los adipocitos (Cartwright, Tchkonian et al. 2007, de Heredia, Larque et al. 2008), y de la liberación de factores proinflamatorios (Bailey-Downs, Tucsek et al. 2013), quisimos analizar el estado inflamatorio del PVAT y su implicación, en la vasodilatación en segmentos de aorta de rata en respuesta a la insulina.

Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de la iNOS, IL-1 β y del TNF- α en el PVAT de las ratas de 24m frente a las de 3m. Igualmente algunos autores han descrito que la expresión de algunos marcadores inflamatorios como el TNF- α , IL-6, IL-18 y la MCP-1 aumentan en el PVAT aórtico de ratas de avanzada edad (Padilla, Jenkins et al. 2013). Dado que la expresión de la iNOS aumenta en presencia de citoquinas inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β (Teng, Zhang et al. 2002, Bhattacharya, Domínguez et al. 2015), es posible que la sobreexpresión de ambas citoquinas en el PVAT induzca un aumento en la expresión génica de la iNOS, aumentando de esta manera la respuesta inflamatoria de este tejido. La RC disminuyó los niveles de ARNm de la iNOS, IL-1 β y el TNF- α en el PVAT. Igualmente, una RC de 40 kcal/día durante 4 semanas en ratas SD de 8 semanas de edad redujo significativamente la expresión del TNF- α en el PVAT (Bussey, Withers et al. 2016). Estos datos sugieren que el envejecimiento induce inflamación en el PVAT por un incremento de la expresión génica del TNF- α , IL-1 β y la iNOS, lo que podría mediar, al menos en parte, la resistencia a la insulina en la aorta.

Esta inflamación, es revertida, en parte, por una RC del 20% durante 3 meses, lo que podría mejorar la sensibilidad vascular a la insulina.

8.1 Efectos del envejecimiento y la RC en segmentos de aorta rodeados por PVAT en respuesta a la insulina

La mayoría de los trabajos publicados en la literatura hasta el momento estudian el papel del PVAT en respuesta a moléculas vasoconstrictoras, como la serotonina (Gollasch 2012), la noradrenalina (Soltis and Cassis 1991) y la angiotensina II (Löhn, Dubrovskaya et al. 2002). Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto del PVAT sobre la respuesta vasodilatadora. El único trabajo que ha valorado el papel del PVAT en la vasodilatación inducida por insulina es el de Meijer et al., (Meijer, Bakker et al. 2013). En este estudio encontraron que tras preincubar una arteriola femoral junto con PVAT de ratones sanos se producía vasodilatación en respuesta a la insulina. Sin embargo, cuando se preincubaba la arteriola femoral con PVAT procedente de ratones diabéticos, se abolía la vasodilatación en respuesta a la insulina.

Teniendo en cuenta la importancia que ejerce el PVAT sobre la regulación del tono vascular y habiendo observado que el PVAT aórtico de las ratas de 24m expresa moléculas proinflamatorias, estudiamos el efecto del PVAT en la respuesta vasodilatadora de los segmentos de aorta en respuesta a la insulina en presencia o ausencia de L-NAME. En contra de lo esperado, los segmentos aórticos de las ratas de 24m presentaron una mayor respuesta vasodilatadora en respuesta a la insulina que los de las ratas de 3m y 24m-RC. Vitorio et al., observaron que el PVAT aórtico torácico de ratas *Wistar* presenta una mayor expresión de la eNOS que el PVAT de la región abdominal (Vitorio, Fontes et al. 2016). En nuestro estudio, la expresión de la eNOS en el PVAT fue significativamente mayor en las ratas de 24m con respecto a las de 3m, efecto que se previno con la RC. Además, aunque no se pesó en este estudio, visualmente las ratas de 24m tenían una mayor cantidad de PVAT que las ratas tanto de 24m-RC como de 3m. Por tanto, estos resultados sugieren que el PVAT aórtico torácico es una gran fuente de NO que, junto con la gran cantidad de PVAT en las ratas de 24m, podría mejorar la relajación en respuesta a la insulina amortiguando la resistencia vascular a la insulina asociada al envejecimiento.

Nuestros resultados muestran que la presencia de PVAT en los segmentos de aorta de las ratas de 3m disminuye la relajación en respuesta a dosis bajas de insulina, efecto que está mediado por el NO. Sin embargo, a dosis elevadas de insulina los segmentos PVAT+L-NAME de las ratas de 3m relajaron más que los segmentos sin PVAT con L-NAME, lo que indica que el PVAT en presencia de L-NAME libera otra/s moléculas que serían las responsables de la vasodilatación en respuesta a la insulina. Una de estas moléculas podría ser el Factor Relajante Derivado de Adipocitos (ADRF), el cual es una molécula vasodilatadora de estructura desconocida liberada por el tejido adiposo que se ha descrito que actúa mediante dos mecanismos de acción; una relajación dependiente del endotelio mediada por la liberación de NO y posterior activación del canal K^+ dependiente del Ca^{2+} (Gao, Lu et al. 2007), y un efecto independiente del endotelio mediado por la activación/apertura de diferentes tipos de canales K^+ dependiendo del tipo de lecho vascular y de las especies (Verlohren, Dubrovskaja et al. 2004, Gao, Zeng et al. 2005).

En el caso de los segmentos de las ratas de 24m, observamos cómo tanto los segmentos con PVAT como los segmentos PVAT+L-NAME relajaron más que los segmentos control y con L-NAME, respectivamente. Además, cuando incubamos los segmentos de aorta con y sin PVAT con insulina observamos que la presencia de PVAT incrementa la liberación de $NO_2 + NO_3$ en las ratas de 24m. Se ha descrito que la modulación del tono vascular mediante la liberación del ADRF por el PVAT es un mecanismo constitutivo independiente de la edad (Gálvez-Prieto, Dubrovskaja et al. 2008), pero está fuertemente relacionado con la cantidad de PVAT, es decir, una menor cantidad de PVAT se correlaciona con un menor efecto vasodilatador del ADRF (Gálvez, de Castro et al. 2006, Gálvez-Prieto, Dubrovskaja et al. 2008). Teniendo en cuenta que las ratas de 24m tienen una mayor cantidad de PVAT rodeando la aorta es posible que dicho tejido libere más cantidad de ADRF que el de las ratas de 3m; Además, los segmentos de aorta de ratas de 24m en presencia de PVAT aumentan la liberación de $NO_2 + NO_3$ en respuesta a insulina, lo que se correlaciona con el incremento observado de la expresión génica de la eNOS en el PVAT de estas ratas. Es posible, por tanto, que la mayor cantidad de PVAT en las ratas de 24m pueda compensar la resistencia a la

insulina asociada al envejecimiento debido a una mayor liberación de ADRF y de NO procedente de la eNOS del PVAT.

En los segmentos de aorta de las ratas de 24m-RC, observamos una situación intermedia entre la encontrada en las ratas de 3m y de 24m, ya que la relajación en respuesta a la insulina en segmentos de aorta torácica rodeados de PVAT es menor que la de las ratas de 24m, diferencias que desaparecen cuando preincubamos los segmentos en presencia de L-NAME, por lo que el efecto parece estar mediado por el NO. La incubación con insulina de los segmentos de aorta de las ratas de 24m-RC con y sin PVAT produjo un aumento en la liberación de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ exclusivamente en los segmentos rodeados por PVAT. Estos resultados podrían estar relacionados, como se ha mencionado anteriormente, tanto por la menor cantidad de PVAT que rodea a la aorta de las ratas de 24m-RC como por la disminución en la expresión de la eNOS en el PVAT, es decir, cuanto menos PVAT menos liberación de NO en respuesta a la insulina (procedente de la menor expresión de la eNOS y de la menor cantidad de ADRF).

Asimismo, cuando estudiamos el efecto del PVAT y del L-NAME en los segmentos de aorta de las ratas 24m-RC, observamos que los segmentos de aorta con PVAT y L-NAME (PVAT+L-NAME) relajaron más que los segmentos de aorta sin PVAT pero con L-NAME (L-NAME), lo que sugiere que la mayor vasodilatación en presencia de PVAT podría deberse a la liberación de ADRF. En cambio, la RC suprime las diferencias encontradas entre los segmentos de aorta sin PVAT y sin L-NAME (Control) y los segmentos de aorta rodeados de PVAT y sin L-NAME (PVAT) que observábamos en las ratas de 24m. Por tanto, cabe pensar que la RC podría mejorar el estado del endotelio, de modo que el PVAT, cuya cantidad es menor en este grupo, puede reducir la expresión de la eNOS así como la cantidad de ADRF liberado en respuesta a la insulina, debido a que la aorta no necesita que el PVAT amortigüe la menor liberación de NO en respuesta a la insulina que se produce en el envejecimiento.

En resumen, el envejecimiento induce cambios en el sistema cardiovascular que afectan a la respuesta a la ET-1 y la insulina en el corazón, induciendo alteraciones en la contractilidad

miocárdica, y en las arterias y células endoteliales alterando la respuesta vascular, lo que podría estar relacionado, al menos en parte, con la aparición tanto de insuficiencia cardiaca como de disfunción endotelial a largo plazo. Un protocolo de RC moderado (20% durante 3 meses) es capaz de prevenir tanto los cambios en la contractilidad miocárdica como la respuesta vascular en respuesta a ambos péptidos, lo que indica que la RC podría ser una estrategia positiva para prevenir/retrasar la aparición de ECV.

CONCLUSIONES

1. La RC previene el aumento de la adiposidad visceral y subcutánea y la disminución del peso del corazón y del músculo gastrocnemio inducidos por el envejecimiento. Asimismo, la RC disminuye los niveles séricos de NEFAs y triglicéridos pero no modifica los niveles de colesterol.
2. En condiciones basales el envejecimiento cursa con un aumento de la presión intraventricular y de la frecuencia cardíaca sin verse afectados ambos parámetros por la RC
3. En el corazón el envejecimiento disminuye la respuesta vasoconstrictora de las arterias coronarias y aumenta la contractilidad y la frecuencia cardíaca en respuesta a la ET-1 atenuándose estas alteraciones con la RC.
4. En el tejido cardíaco la RC previene el aumento en la expresión génica del TNF- α y de la iNOS y la disminución en la expresión génica de la eNOS y los receptores ET_B inducidos por el envejecimiento.
5. En el tejido arterial la RC previene el aumento en la expresión génica de la iNOS y la disminución en los niveles de ARNm de la eNOS asociados al envejecimiento pero no modifica el aumento en la vasoconstricción de las arterias renales en respuesta a la ET-1.
6. En respuesta a la insulina, el envejecimiento cursa con una disminución en la contractilidad cardíaca y un aumento en la vasoconstricción coronaria debido a una menor activación de la vía de señalización PI3K/Akt en el tejido cardíaco. La RC no previene las alteraciones en la vasodilatación coronaria pero sí atenúa la disminución en la contractilidad del miocardio en respuesta a esta hormona.
7. En la aorta, el envejecimiento cursa con una disminución en la respuesta vasodilatadora en respuesta a la insulina a causa de una menor activación de la vía de señalización de PI3K/Akt en el endotelio. La RC moderada previene, al menos en parte, la resistencia vascular a la insulina asociada al envejecimiento aumentando la activación de esta vía y la consiguiente producción de NO.
8. El PVAT de los animales de avanzada edad expresa mayores niveles de eNOS y marcadores proinflamatorios que el de los animales jóvenes y sometidos a RC. Estos cambios no se traducen en

un deterioro de la respuesta vasodilatadora ya que la presencia de PVAT aumenta la respuesta vasodilatadora de los segmentos de aorta en respuesta a la insulina, efecto que se previene parcialmente con la RC.

En términos generales nuestros resultados muestran que un protocolo de RC moderado puede ser una estrategia útil para disminuir algunas de las alteraciones cardiovasculares asociadas al envejecimiento. Queda por determinar si cambios en la intensidad y/o duración de la RC podrían haber producido alteraciones más evidentes tanto en términos moleculares como funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R. D., R. J. Garrison, P. W. Wilson, F. H. Epstein, W. P. Castelli, M. Feinleib and C. LaRue (1983). "Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study." Arteriosclerosis (Dallas, Tex.) **3**: 260-272.
- Abel, E. D. (2004). "Glucose transport in the heart." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **9**: 201-215.
- Abel, E. D., S. E. Litwin and G. Sweeney (2008). "Cardiac remodeling in obesity." Physiological reviews **88**: 389-419.
- Afiatpour, P., J. Latifpour, W. Takahashi, M. Yono, H. E. Foster, K. Ikeda, M. Pouresmail and R. M. Weiss (2003). "Developmental changes in the functional, biochemical and molecular properties of rat bladder endothelin receptors." Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology **367**: 462-472.
- Agarwal, S. and R. S. Sohal (1994). "Aging and proteolysis of oxidized proteins." Archives of biochemistry and biophysics **309**: 24-28.
- Agui, T., X. Xin, Y. Cai, T. Sakai and K. Matsumoto (1994). "Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells." Blood **84**: 2531-2538.
- Ajuwon, K. M. and M. E. Spurlock (2005). "Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes." The Journal of nutrition **135**: 1841-1846.
- Akingbemi, B. T. (2013). "Adiponectin receptors in energy homeostasis and obesity pathogenesis." Progress in molecular biology and translational science **114**: 317-342.
- Alberts, G. F., K. A. Peifley, A. Johns, J. F. Kleha and J. A. Winkles (1994). "Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop." The Journal of biological chemistry **269**: 10112-10118.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Current biology : CB **7**: 261-269.
- AlGhatrif, M., V. L. Watts, X. Niu, M. Halushka, K. L. Miller, K. Vandegaer, D. Bedja, K. Fox-Talbot, A. Bielawska, K. L. Gabrielson and others (2013). "Beneficial cardiac effects of caloric restriction are lost with age in a murine model of obesity." Journal of cardiovascular translational research **6**(3): 436-445.
- Allen, J. and V. Morelli (2011). "Aging and exercise." Clinics in geriatric medicine **27**: 661-671.
- Anderson, R. M. and R. Weindruch (2012). "The caloric restriction paradigm: implications for healthy human aging." American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council **24**: 101-106.
- Andreozzi, F., E. Laratta, C. Procopio, M. L. Hribal, A. Sciacqua, M. Perticone, C. Miele, F. Perticone and G. Sesti (2007). "Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells." Molecular and cellular biology **27**: 2372-2383.
- Annoni, G., G. Luvarà, B. Arosio, N. Gagliano, F. Fiordaliso, D. Santambrogio, G. Jeremic, L. Mircoli, R. Latini, C. Vergani and S. Masson (1998). "Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium." Mechanisms of ageing and development **101**: 57-72.
- Anson, R. M., Z. Guo, R. de Cabo, T. Iyun, M. Rios, A. Hagepanos, D. K. Ingram, M. A. Lane and M. P. Mattson (2003). "Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6216-6220.
- Arıcı, M. A. A., M. Buyukdeligoz, S. Kalkan and Y. Tuncok (2013). "Effects of BQ-788 on amitriptyline-induced cardiovascular toxicity." Human & experimental toxicology **32**: 316-322.

- Atkinson, J. (2008). "Age-related medial elastocalcinosis in arteries: mechanisms, animal models, and physiological consequences." Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) **105**: 1643-1651.
- Avruch, J. (1998). "Insulin signal transduction through protein kinase cascades." Molecular and cellular biochemistry **182**: 31-48.
- Aye, M., W. Sheedy, R. Harrison, J. S. Thompson, A. H. Morice and E. A. Masson (2003). "Pulmonary vasodilation in the rat by insulin in vitro could indicate potential hazard for inhaled insulin." Diabetologia **46**(9): 1199-1202.
- Bailey-Downs, L. C., Z. Tucsek, P. Toth, D. Sosnowska, T. Gautam, W. E. Sonntag, A. Csiszar and Z. Ungvari (2013). "Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **68**: 780-792.
- Baron, A. D. (1994). "Hemodynamic actions of insulin." The American journal of physiology **267**: E187-E202.
- Barton, M. (2014). "Aging and endothelin: determinants of disease." Life sciences **118**(2): 97-109.
- Barton, M., F. Cosentino, R. P. Brandes, P. Moreau, S. Shaw and T. F. Lüscher (1997). "Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **30**: 817-824.
- Begum, N., N. Duddy, O. Sandu, J. Reinzie and L. Ragolia (2000). "Regulation of myosin-bound protein phosphatase by insulin in vascular smooth muscle cells: evaluation of the role of Rho kinase and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signaling pathways." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **14**: 1365-1376.
- Begum, N., L. Ragolia, J. Rienzie, M. McCarthy and N. Duddy (1998). "Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by insulin in vascular smooth muscle cells. Evaluation of the role of the nitric oxide signaling pathway and potential defects in hypertension." The Journal of biological chemistry **273**: 25164-25170.
- Bellien, J., C. Thuillez and R. Joannides (2008). "Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans." Fundamental & clinical pharmacology **22**: 363-377.
- Berg, A. H. and P. E. Scherer (2005). "Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease." Circulation research **96**: 939-949.
- Bergandi, L., F. Silvagno, I. Russo, C. Riganti, G. Anfossi, E. Aldieri, D. Ghigo, M. Trovati and A. Bosia (2003). "Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **23**: 2215-2221.
- Berweck, S., H. Thieme, A. Lepple-Wienhues, H. Helbig and M. Wiederholt (1993). "Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes." Investigative ophthalmology & visual science **34**: 3402-3407.
- Bhattacharya, I., A. P. Domínguez, K. Dräger, R. Humar, E. Haas and E. J. Battegay (2015). "Hypoxia potentiates tumor necrosis factor- α induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes." Biochemical and biophysical research communications **461**: 287-292.
- Bogan, J. S. and K. V. Kandror (2010). "Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4." Current opinion in cell biology **22**: 506-512.
- Bonadonna, R. C., L. C. Groop, D. C. Simonson and R. A. DeFronzo (1994). "Free fatty acid and glucose metabolism in human aging: evidence for operation of the Randle cycle." The American journal of physiology **266**: E501-E509.
- Bonkowski, M. S., F. P. Dominici, O. Arum, J. S. Rocha, K. A. Al Regaiey, R. Westbrook, A. Spong, J. Panici, M. M. Masternak, J. J. Kopchick and A. Bartke (2009). "Disruption of

- growth hormone receptor prevents calorie restriction from improving insulin action and longevity." *PloS one* **4**: e4567.
- Bonnema, D. D., C. S. Webb, W. R. Pennington, R. E. Stroud, A. E. Leonardi, L. L. Clark, C. D. McClure, L. Finklea, F. G. Spinale and M. R. Zile (2007). "Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)." *Journal of cardiac failure* **13**: 530-540.
- Botta, A., I. Laher, J. Beam, D. Decoffe, K. Brown, S. Halder, A. Devlin, D. L. Gibson and S. Ghosh (2013). "Short term exercise induces PGC-1 α , ameliorates inflammation and increases mitochondrial membrane proteins but fails to increase respiratory enzymes in aging diabetic hearts." *PloS one* **8**: e70248.
- Boulanger, C. and T. F. Lüscher (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." *The Journal of clinical investigation* **85**: 587-590.
- Boulanger, C. M., C. Heymes, J. Benessiano, R. S. Geske, B. I. Lévy and P. M. Vanhoutte (1998). "Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension." *Circulation research* **83**: 1271-1278.
- Bousette, N. and A. Giaid (2003). "Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies." *Canadian journal of physiology and pharmacology* **81**: 578-587.
- Boyle, A. J., H. Shih, J. Hwang, J. Ye, B. Lee, Y. Zhang, D. Kwon, K. Jun, D. Zheng, R. Sievers and others (2011). "Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy." *Experimental gerontology* **46**(7): 549-559.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Brooks, W. W. and C. H. Conrad (2000). "Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice." *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**: 187-195.
- Brophy, C. M., L. Knoepp, J. Xin and J. S. Pollock (2000). "Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **278**: H991-H997.
- Brownlee, M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." *Diabetes* **54**: 1615-1625.
- Brownsey, R. W., A. N. Boone and M. F. Allard (1997). "Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms." *Cardiovascular research* **34**: 3-24.
- Bucala, R., K. J. Tracey and A. Cerami (1991). "Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes." *The Journal of clinical investigation* **87**: 432-438.
- Bujak, M. and N. G. Frangogiannis (2007). "The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling." *Cardiovascular research* **74**: 184-195.
- Busse, R. and I. Fleming (1998). "Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors." *Journal of vascular research* **35**: 73-84.
- Bussey, C. E., S. B. Withers, R. G. Aldous, G. Edwards and A. M. Heagerty (2016). "Obesity-Related Perivascular Adipose Tissue Damage Is Reversed by Sustained Weight Loss in the Rat." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **36**: 1377-1385.
- Cai, H., Z. Yuan, Q. Fei and J. Zhao (2012). "Investigation of thrombospondin-1 and transforming growth factor- β expression in the heart of aging mice." *Experimental and therapeutic medicine* **3**: 433-436.
- Camps, M., A. Castelló, P. Muñoz, M. Monfar, X. Testar, M. Palacín and A. Zorzano (1992). "Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter

- expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle." The Biochemical journal **282** (Pt 3): 765-772.
- Candore, G., C. Caruso, E. Jirillo, T. Magrone and S. Vasto (2010). "Low grade inflammation as a common pathogenetic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successful ageing achievement." Current pharmaceutical design **16**: 584-596.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science (New York, N.Y.) **296**: 1655-1657.
- Capasso, J. M., T. Palackal, G. Olivetti and P. Anversa (1990). "Severe myocardial dysfunction induced by ventricular remodeling in aging rat hearts." The American journal of physiology **259**: H1086-H1096.
- Carlson, L. A., b. Fr"o, S. O. and E. R. Nye (1968). "Effect of age on blood and tissue lipid levels in the male rat." Gerontology **14**(2): 65-79.
- Carnagarin, R., A. M. Dharmarajan and C. R. Dass (2015). "Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle--A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance." Molecular and cellular endocrinology **417**: 52-62.
- Cartee, G. D., E. W. Kietzke and C. Briggs-Tung (1994). "Adaptation of muscle glucose transport with caloric restriction in adult, middle-aged, and old rats." The American journal of physiology **266**: R1443-R1447.
- Cartwright, M. J., T. Tchkonja and J. L. Kirkland (2007). "Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms." Experimental gerontology **42**: 463-471.
- Carvalho, C. R., S. L. Brenelli, A. C. Silva, A. L. Nunes, L. A. Velloso and M. J. Saad (1996). "Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats." Endocrinology **137**: 151-159.
- Castello, L., T. Froio, M. Maina, G. Cavallini, F. Biasi, G. Leonarduzzi, A. Donati, E. Bergamini, G. Poli and E. Chiarpotto (2010). "Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF-kB activation." Free radical biology & medicine **48**: 47-54.
- Catalucci, D. and G. Condorelli (2006). "Effects of Akt on cardiac myocytes: location counts." Circulation research **99**: 339-341.
- Catalucci, D., D.-H. Zhang, J. DeSantiago, F. Aimond, G. Barbara, J. Chemin, D. Bonci, E. Picht, F. Rusconi, N. D. Dalton, K. L. Peterson, S. Richard, D. M. Bers, J. H. Brown and G. Condorelli (2009). "Akt regulates L-type Ca²⁺ channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability." The Journal of cell biology **184**: 923-933.
- Cefalu, W. T. (2001). "Insulin resistance: cellular and clinical concepts." Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.) **226**: 13-26.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, D. J. Spiegelhalter, D. Georgakopoulos, J. Robinson and J. E. Deanfield (1994). "Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women." Journal of the American College of Cardiology **24**: 471-476.
- Cesari, M., B. W. J. H. Penninx, A. B. Newman, S. B. Kritchevsky, B. J. Nicklas, K. Sutton-Tyrrell, S. M. Rubin, J. Ding, E. M. Simonsick, T. B. Harris and M. Pahor (2003). "Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study." Circulation **108**: 2317-2322.
- Cingolani, H. E., N. G. Pérez, E. A. Aiello and M. C. C. de Hurtado (2005). "Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop." Regulatory peptides **128**: 211-220.
- Cirilo, C. P., J. P. F. Schoffen, A. P. de Santi-Rampazzo, M. C. V. U. Zapater, F. A. Vicentini, J. F. Comar and M. R. M. Natali (2013). "Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats." Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.) **29**: 673-680.

- Clark, M. G. (2008). "Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **295**: E732-E750.
- Clark, M. G., M. G. Wallis, E. J. Barrett, M. A. Vincent, S. M. Richards, L. H. Clerk and S. Rattigan (2003). "Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **284**: E241-E258.
- Clarke, J. O. H. N. G., N. I. G. E. L. Benjamin, S. I. M. O. N. W. Larkin, D. A. V. I. D. J. Webb, G. R. A. H. A. M. J. Davies and A. Maseri (1989). "Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **257**(6): H2033-H2035.
- Clerk, A., M. A. Bogoyevitch, M. B. Anderson and P. H. Sugden (1994). "Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts." The Journal of biological chemistry **269**: 32848-32857.
- Clozel, M. and J. P. Clozel (1989). "Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **250**: 1125-1131.
- Clozel, M., P. Hess, C. Qiu, S.-S. Ding and M. Rey (2006). "The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **316**: 1115-1121.
- Coker, R. H., S. Miller, S. Schutzler, N. Deutz and R. R. Wolfe (2012). "Whey protein and essential amino acids promote the reduction of adipose tissue and increased muscle protein synthesis during caloric restriction-induced weight loss in elderly, obese individuals." Nutrition journal **11**: 105.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz and R. Weindruch (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science (New York, N.Y.) **325**: 201-204.
- Colman, R. J., J. J. Ramsey, E. B. Roecker, T. Havighurst, J. C. Hudson and J. W. Kemnitz (1999). "Body fat distribution with long-term dietary restriction in adult male rhesus macaques." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **54**: B283-B290.
- Combs, T. P., A. H. Berg, M. W. Rajala, S. Klebanov, P. Iyengar, J. C. Jimenez-Chillaron, M. E. Patti, S. L. Klein, R. S. Weinstein and P. E. Scherer (2003). "Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin." Diabetes **52**: 268-276.
- Condorelli, G., A. Drusco, G. Stassi, A. Bellacosa, R. Roncarati, G. Iaccarino, M. A. Russo, Y. Gu, N. Dalton, C. Chung, M. V. G. Latronico, C. Napoli, J. Sadoshima, C. M. Croce and J. Ross (2002). "Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 12333-12338.
- Contreras, C., A. Sánchez, A. García-Sacristán, M. C. Martínez, R. Andriantsitohaina and D. Prieto (2011). "Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant obese Zucker rats." Atherosclerosis **217**: 331-339.
- Coppé, J.-P., C. K. Patil, F. Rodier, A. Krtolica, C. M. Beauséjour, S. Parrinello, J. G. Hodgson, K. Chin, P.-Y. Desprez and J. Campisi (2010). "A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen." PloS one **5**: e9188.
- Coppedè, F. (2012). "Premature aging syndrome." Advances in experimental medicine and biology **724**: 317-331.

- Csiszar, A., Z. Ungvari, J. G. Edwards, P. Kaminski, M. S. Wolin, A. Koller and G. Kaley (2002). "Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function." Circulation research **90**: 1159-1166.
- Csiszar, A., Z. Ungvari, A. Koller, J. G. Edwards and G. Kaley (2003). "Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **17**: 1183-1185.
- Csiszar, A., Z. Ungvari, A. Koller, J. G. Edwards and G. Kaley (2004). "Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging." Physiological genomics **17**(1): 21-30.
- Cusi, K., K. Maezono, A. Osman, M. Pendergrass, M. E. Patti, T. Pratipanawatr, R. A. DeFronzo, C. R. Kahn and L. J. Mandarino (2000). "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle." The Journal of clinical investigation **105**: 311-320.
- Chandran, M., S. A. Phillips, T. Ciaraldi and R. R. Henry (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?" Diabetes care **26**: 2442-2450.
- Chatterjee, A., S. M. Black and J. D. Catravas (2008). "Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation." Vascular pharmacology **49**: 134-140.
- Cheatham, B. and C. R. Kahn (1995). "Insulin action and the insulin signaling network." Endocrine reviews **16**: 117-142.
- Chen, S., T. Evans, K. Mukherjee, M. Karmazyn and S. Chakrabarti (2000). "Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors." Journal of molecular and cellular cardiology **32**: 1621-1629.
- Chisalita, S. I. and H. J. Arnqvist (2005). "Expression and function of receptors for insulin-like growth factor-I and insulin in human coronary artery smooth muscle cells." Diabetologia **48**: 2155-2161.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." BioTechniques **15**: 532-534, 536-537.
- Chou, T. C., M. H. Yen, C. Y. Li and Y. A. Ding (1998). "Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **31**: 643-648.
- Davey, K. A. B., P. B. Garlick, A. Warley and R. Southworth (2007). "Immunogold labeling study of the distribution of GLUT-1 and GLUT-4 in cardiac tissue following stimulation by insulin or ischemia." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **292**: H2009-H2019.
- Davidoff, A. J. (2006). "Convergence of glucose- and fatty acid-induced abnormal myocardial excitation-contraction coupling and insulin signalling." Clinical and experimental pharmacology & physiology **33**: 152-158.
- Davidson, H. W. (2004). "(Pro)Insulin processing: a historical perspective." Cell biochemistry and biophysics **40**: 143-158.
- Davidson, M. B. (1979). "The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly." Metabolism: clinical and experimental **28**: 688-705.
- Davis, M. J. and M. A. Hill (1999). "Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response." Physiological reviews **79**: 387-423.
- Dawood, T. and M. P. Schlaich (2009). "Mediators of target organ damage in hypertension: focus on obesity associated factors and inflammation." Minerva cardioangiologica **57**: 687-704.
- de Heredia, F. P., E. Larque, M. D. P. Portillo, M. Canteras, S. Zamora and M. Garaulet (2008). "Age-related changes in fatty acids from different adipose depots in rat and their

- association with adiposity and insulin." Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.) **24**: 1013-1022.
- De Meyts, P. (2008). "The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors?" Trends in biochemical sciences **33**: 376-384.
- De Solís, A. J., T. Fernández-Agulló, M. García-SanFrutos, P. Pérez-Pardo, E. Bogónez, A. Andrés, M. Ros and J. M. Carrascosa (2012). "Impairment of skeletal muscle insulin action with aging in Wistar rats: role of leptin and caloric restriction." Mechanisms of ageing and development **133**: 306-316.
- DeFronzo, R. A. and E. Ferrannini (1991). "Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease." Diabetes care **14**: 173-194.
- Del Ry, S., M. Maltinti, D. Giannessi, G. Cavallini and E. Bergamini (2008). "Age-related changes in endothelin-1 receptor subtypes in rat heart." Experimental aging research **34**: 251-266.
- Delahanty, L. M. and D. M. Nathan (2008). "Implications of the diabetes prevention program and Look AHEAD clinical trials for lifestyle interventions." Journal of the American Dietetic Association **108**: S66-S72.
- Denault, J. B., A. Claing, P. D'Orléans-Juste, T. Sawamura, T. Kido, T. Masaki and R. Leduc (1995). "Processing of proendothelin-1 by human furin convertase." FEBS letters **362**: 276-280.
- DeQuach, J. A., V. Mezzano, A. Miglani, S. Lange, G. M. Keller, F. Sheikh and K. L. Christman (2010). "Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture." PloS one **5**: e13039.
- Després, J.-P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**: 881-887.
- Despres, J. P. (1992). "Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome." Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.) **9**(5): 452-459.
- Dhaun, N., J. Goddard, D. E. Kohan, D. M. Pollock, E. L. Schiffrin and D. J. Webb (2008). "Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **52**: 452-459.
- Dolinsky, V. W. and J. R. B. Dyck (2011). "Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease." Biochimica et biophysica acta **1812**: 1477-1489.
- Domenighetti, A. A., V. R. Danes, C. L. Curl, J. M. Favaloro, J. Proietto and L. M. D. Delbridge (2010). "Targeted GLUT-4 deficiency in the heart induces cardiomyocyte hypertrophy and impaired contractility linked with Ca(2+) and proton flux dysregulation." Journal of molecular and cellular cardiology **48**: 663-672.
- Donato, A. J., L. A. Lesniewski and M. D. Delp (2005). "The effects of aging and exercise training on endothelin-1 vasoconstrictor responses in rat skeletal muscle arterioles." Cardiovascular research **66**(2): 393-401.
- Douglas, S. A., D. Dhanak and D. G. Johns (2004). "From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function." Trends in pharmacological sciences **25**: 76-85.
- Du, X. L., D. Edelstein, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui and M. Brownlee (2001). "Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site." The Journal of clinical investigation **108**: 1341-1348.
- Edwards, I. J., L. L. Rudel, J. G. Terry, J. W. Kemnitz, R. Weindruch and W. T. Cefalu (1998). "Caloric restriction in rhesus monkeys reduces low density lipoprotein interaction with arterial proteoglycans." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **53**: B443-B448.

- Endoh, M., S. Fujita, H. T. Yang, M. A. Talukder, J. Maruya and I. Norota (1998). "Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium." *Life sciences* **62**: 1485-1489.
- Escriva, F., M. Agote, E. Rubio, J. C. Molero, A. M. Pascual-Leone, A. Andres, J. Satrustegui and J. M. Carrascosa (1997). "In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats." *Endocrinology* **138**: 49-54.
- Escrivá, F., M. L. Gavete, Y. Fermín, C. Pérez, N. Gallardo, C. Alvarez, A. Andrés, M. Ros and J. M. Carrascosa (2007). "Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity." *The Journal of endocrinology* **194**: 131-141.
- Facchetti, F., E. Monzani, G. Cavallini, E. Bergamini and C. A. M. La Porta (2007). "Effect of a caloric restriction regimen on the angiogenic capacity of aorta and on the expression of endothelin-1 during ageing." *Experimental gerontology* **42**: 662-667.
- Fernández-Galaz, C., T. Fernández-Agulló, C. Pérez, S. Peralta, C. Arribas, A. Andrés, J. M. Carrascosa and M. Ros (2002). "Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats." *Diabetologia* **45**: 997-1003.
- Fernández-Real, J. M. and W. Ricart (2003). "Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome." *Endocrine reviews* **24**: 278-301.
- Ferrari, A. U., A. Radaelli and M. Centola (2003). "Invited review: aging and the cardiovascular system." *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **95**: 2591-2597.
- Fleming, I. and R. Busse (2003). "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **284**: R1-12.
- Fontana, L., T. E. Meyer, S. Klein and J. O. Holloszy (2004). "Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6659-6663.
- Formoso, G., H. Chen, J.-a. Kim, M. Montagnani, A. Consoli and M. J. Quon (2006). "Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in vascular endothelium." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **20**: 1153-1163.
- Franceschi, C., M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani and G. De Benedictis (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." *Annals of the New York Academy of Sciences* **908**: 244-254.
- Fujii, K., S. Ohmori, M. Tominaga, I. Abe, Y. Takata, Y. Ohya, K. Kobayashi and M. Fujishima (1993). "Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery." *The American journal of physiology* **265**: H509-H516.
- Fulop, T., A. Larbi and N. Douziech (2003). "Insulin receptor and ageing." *Pathologie-biologie* **51**: 574-580.
- Gabriely, I., X. H. Ma, X. M. Yang, G. Atzmon, M. W. Rajala, A. H. Berg, P. Scherer, L. Rossetti and N. Barzilai (2002). "Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process?" *Diabetes* **51**: 2951-2958.
- Gálvez-Prieto, B., G. Dubrovskaya, M. V. Cano, M. Delgado, I. Arangué, M. C. González, M. Ruiz-Gayo, M. Gollasch and M. S. Fernández-Alfonso (2008). "A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats." *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **31**: 1415-1423.
- Gálvez, B., J. de Castro, D. Herold, G. Dubrovskaya, S. Arribas, M. C. González, I. Arangué, F. C. Luft, M. P. Ramos, M. Gollasch and M. S. Fernández Alfonso (2006). "Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**: 1297-1302.

- Gao, F., E. Gao, T.-L. Yue, E. H. Ohlstein, B. L. Lopez, T. A. Christopher and X.-L. Ma (2002). "Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation." Circulation **105**: 1497-1502.
- Gao, Y.-J., C. Lu, L.-Y. Su, A. M. Sharma and R. M. K. W. Lee (2007). "Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide." British journal of pharmacology **151**(3): 323-331.
- Gao, Y.-J., Z.-h. Zeng, K. Teoh, A. M. Sharma, L. Abouzahr, I. Cybulsky, A. Lamy, L. Semelhago and R. M. K. W. Lee (2005). "Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery." The Journal of thoracic and cardiovascular surgery **130**: 1130-1136.
- Gao, Z., X. Zhang, A. Zuberi, D. Hwang, M. J. Quon, M. Lefevre and J. Ye (2004). "Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **18**: 2024-2034.
- García-San Frutos, M., T. Fernández-Agulló, J. M. Carrascosa, D. Horrillo, M. T. Barrús, E. Oliveros, J. Sierra and M. Ros (2012). "Involvement of protein tyrosine phosphatases and inflammation in hypothalamic insulin resistance associated with ageing: effect of caloric restriction." Mechanisms of ageing and development **133**: 489-497.
- García-San Frutos, M., T. Fernández-Agulló, A. J. De Solís, A. Andrés, C. Arribas, J. M. Carrascosa and M. Ros (2007). "Impaired central insulin response in aged Wistar rats: role of adiposity." Endocrinology **148**: 5238-5247.
- Go, A. S., D. Mozaffarian, V. L. Roger, E. J. Benjamin, J. D. Berry, M. J. Blaha, S. Dai, E. S. Ford, C. S. Fox, S. Franco, H. J. Fullerton, C. Gillespie, S. M. Hailpern, J. A. Heit, V. J. Howard, M. D. Huffman, S. E. Judd, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, R. H. Mackey, D. J. Magid, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, D. K. McGuire, E. R. Mohler, C. S. Moy, M. E. Mussolino, R. W. Neumar, G. Nichol, D. K. Pandey, N. P. Paynter, M. J. Reeves, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T. N. Turan, S. S. Virani, N. D. Wong, D. Woo, M. B. Turner, A. H. A. S. Committee and S. S. Subcommittee (2014). "Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association." Circulation **129**: e28-e292.
- Goettsch, W., T. Lattmann, K. Amann, M. Szibor, H. Morawietz, K. Münter, S. P. Müller, S. Shaw and M. Barton (2001). "Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis." Biochemical and biophysical research communications **280**: 908-913.
- Goldin, A., J. A. Beckman, A. M. Schmidt and M. A. Creager (2006). "Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury." Circulation **114**: 597-605.
- Gollasch, M. (2012). "Vasodilator signals from perivascular adipose tissue." British journal of pharmacology **165**: 633-642.
- Goodwin, A. T., M. Amrani, A. J. Marchbank, C. C. Gray, J. Jayakumar and M. H. Yacoub (1999). "Coronary vasoconstriction to endothelin-1 increases with age before and after ischaemia and reperfusion." Cardiovascular research **41**: 554-562.
- Gould, A. L., G. M. Davies, E. Alemao, D. D. Yin and J. R. Cook (2007). "Cholesterol reduction yields clinical benefits: meta-analysis including recent trials." Clinical therapeutics **29**: 778-794.
- Gredilla, R., A. Sanz, M. Lopez-Torres and G. Barja (2001). "Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **15**: 1589-1591.
- Greenfield, M. S., F. Kraemer, T. Tobey and G. Reaven (1980). "Effect of age on plasma triglyceride concentrations in man." Metabolism: clinical and experimental **29**: 1095-1099.

- Gresl, T. A., R. J. Colman, E. B. Roecker, T. C. Havighurst, Z. Huang, D. B. Allison, R. N. Bergman and J. W. Kemnitz (2001). "Dietary restriction and glucose regulation in aging rhesus monkeys: a follow-up report at 8.5 yr." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **281**: E757-E765.
- Grinnan, D., G. Farr, A. Fox and L. Sweeney (2016). "The Role of Hyperglycemia and Insulin Resistance in the Development and Progression of Pulmonary Arterial Hypertension." Journal of diabetes research **2016**: 2481659.
- Guan, Z., J. P. VanBeusecum and E. W. Inscho (2015). "Endothelin and the renal microcirculation." Seminars in nephrology **35**: 145-155.
- Guidry, C. and M. Hook (1991). "Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts." The Journal of cell biology **115**: 873-880.
- Guo, Z., F. Mitchell-Raymundo, H. Yang, Y. Ikeno, J. Nelson, V. Diaz, A. Richardson and R. Reddick (2002). "Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice." Mechanisms of ageing and development **123**: 1121-1131.
- Guzik, T. J., P. J. Marvar, M. Czesnikiewicz-Guzik and R. Korbut (2007). "Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society **58**: 591-610.
- Haffner, S. M. (1998). "The importance of hyperglycemia in the nonfasting state to the development of cardiovascular disease." Endocrine reviews **19**: 583-592.
- Haller, H., T. Schaberg, C. Lindschau, H. Lode and A. Distler (1991). "Endothelin increases [Ca²⁺]_i, protein phosphorylation, and O₂⁻ production in human alveolar macrophages." The American journal of physiology **261**: L478-L484.
- Han, X., S. Turdi, N. Hu, R. Guo, Y. Zhang and J. Ren (2012). "Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice." The Journal of nutritional biochemistry **23**: 1592-1599.
- Harman, D. (2001). "Aging: overview." Annals of the New York Academy of Sciences **928**: 1-21.
- Hartell, N. A., H. E. Archer and C. J. Bailey (2005). "Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B." Biochemical pharmacology **69**: 781-790.
- Harvey, A., A. C. Montezano and R. M. Touyz (2015). "Vascular biology of ageing-Implications in hypertension." Journal of molecular and cellular cardiology **83**: 112-121.
- Hasdai, D., R. Kornowski and A. Battler (1994). "Endothelin and myocardial ischemia." Cardiovascular drugs and therapy **8**: 589-599.
- Haveman-Nies, A., L. C. P. G. M. de Groot and W. A. van Staveren (2003). "Dietary quality, lifestyle factors and healthy ageing in Europe: the SENECA study." Age and ageing **32**: 427-434.
- Hawkins, M., N. Barzilai, R. Liu, M. Hu, W. Chen and L. Rossetti (1997). "Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance." The Journal of clinical investigation **99**: 2173-2182.
- Heymes, C., A. Habib, D. Yang, E. Mathieu, F. Marotte, J. Samuel and C. M. Boulanger (2000). "Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing." British journal of pharmacology **131**: 804-810.
- Higami, Y., J. L. Barger, G. P. Page, D. B. Allison, S. R. Smith, T. A. Prolla and R. Weindruch (2006). "Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue." The Journal of nutrition **136**: 343-352.
- Hipkiss, A. R. (2007). "Dietary restriction, glycolysis, hormesis and ageing." Biogerontology **8**: 221-224.

- Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Görgün, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin and G. S. Hotamisligil (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**: 333-336.
- Hofman, F. M., P. Chen, R. Jeyaseelan, F. Incardona, M. Fisher and R. Zidovetzki (1998). "Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells." Blood **92**: 3064-3072.
- Horillo, D., J. Sierra, C. Arribas, M. García-San Frutos, J. M. Carrascosa, N. Lauzurica, T. Fernández-Agulló and M. Ros (2011). "Age-associated development of inflammation in Wistar rats: Effects of caloric restriction." Archives of physiology and biochemistry **117**: 140-150.
- Hsueh, W. A. and R. E. Law (1999). "Insulin signaling in the arterial wall." The American journal of cardiology **84**: 21J-24J.
- Huggins, C. E., A. A. Domenighetti, M. E. Ritchie, N. Khalil, J. M. Favalaro, J. Proietto, G. K. Smyth, S. Pepe and L. M. D. Delbridge (2008). "Functional and metabolic remodelling in GLUT4-deficient hearts confers hyper-responsiveness to substrate intervention." Journal of molecular and cellular cardiology **44**: 270-280.
- Humana, F. i., a (2005). La base de la Medicina. G. Pocock y CD Richards. 2} edicion. Ed.
- Hutton, J. C. (1994). "Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases." Diabetologia **37 Suppl 2**: S48-S56.
- Iemitsu, M., T. Miyauchi, S. Maeda, T. Tanabe, Y. Irukayama-Tomobe, K. Goto, M. Matsuda and I. Yamaguchi (2002). "Effects of aging and subsequent exercise training on gene expression of endothelin-1 in rat heart." Clinical science (London, England : 1979) **103 Suppl 48**: 152S-157S.
- Inoguchi, T., P. Li, F. Umeda, H. Y. Yu, M. Kakimoto, M. Imamura, T. Aoki, T. Etoh, T. Hashimoto, M. Naruse, H. Sano, H. Utsumi and H. Nawata (2000). "High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells." Diabetes **49**: 1939-1945.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, Y. Mitsui, M. Kobayashi and T. Masaki (1989). "The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression." The Journal of biological chemistry **264**: 14954-14959.
- Ishikawa, T., M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto and T. Masaki (1988). "Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide." Pflugers Archiv : European journal of physiology **413**: 108-110.
- Ishikawa, T., M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto and T. Masaki (1988). "Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria." The American journal of physiology **255**: H970-H973.
- Itani, S. I., N. B. Ruderman, F. Schmieder and G. Boden (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha." Diabetes **51**: 2005-2011.
- Jialal, I., S. Devaraj and S. K. Venugopal (2004). "C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?" Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **44**: 6-11.
- Jiang, Z., B. Yu and Y. Li (2016). "Effect of Three Statins on Glucose Uptake of Cardiomyocytes and its Mechanism." Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research **22**: 2825-2830.
- Jiang, Z. Y., Y. W. Lin, A. Clemont, E. P. Feener, K. D. Hein, M. Igarashi, T. Yamauchi, M. F. White and G. L. King (1999). "Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats." The Journal of clinical investigation **104**: 447-457.

- Johansson, G. S. and H. J. Arnqvist (2006). "Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **291**: E1124-E1130.
- Judge, S., Y. M. Jang, A. Smith, T. Hagen and C. Leeuwenburgh (2005). "Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **19**: 419-421.
- Jung, K. J., E. K. Lee, J. Y. Kim, Y. Zou, B. Sung, H. S. Heo, M. K. Kim, J. Lee, N. D. Kim, B. P. Yu and H. Y. Chung (2009). "Effect of short term calorie restriction on pro-inflammatory NF-kB and AP-1 in aged rat kidney." Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] **58**: 143-150.
- Jung, U. J. and M.-S. Choi (2014). "Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease." International journal of molecular sciences **15**: 6184-6223.
- Kahn, A. M., J. C. Allen, C. L. Seidel and T. Song (1994). "Insulin inhibits serotonin-induced Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle." Circulation **90**: 384-390.
- Kahn, A. M., A. Husid, J. C. Allen, C. L. Seidel and T. Song (1997). "Insulin acutely inhibits cultured vascular smooth muscle cell contraction by a nitric oxide synthase-dependent pathway." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **30**: 928-933.
- Kahn, A. M., C. L. Seidel, J. C. Allen, R. G. O'Neil, H. Shelat and T. Song (1993). "Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **22**: 735-742.
- Kang, L. S., R. A. Reyes and J. M. Muller-Delp (2009). "Aging impairs flow-induced dilation in coronary arterioles: role of NO and H₂O₂." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **297**: H1087-H1095.
- Kass, D. A. (2002). "Age-related changes in ventricular-arterial coupling: pathophysiologic implications." Heart failure reviews **7**: 51-62.
- Katakam, P. V. G., C. D. Tulbert, J. A. Snipes, B. Erdös, A. W. Miller and D. W. Busija (2005). "Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **288**: H854-H860.
- Katusic, Z. S. and P. M. Vanhoutte (1986). "Anoxic contractions in isolated canine cerebral arteries: contribution of endothelium-derived factors, metabolites of arachidonic acid, and calcium entry." Journal of cardiovascular pharmacology **8 Suppl 8**: S97-101.
- Kaumann, A., S. Bartel, P. Molenaar, L. Sanders, K. Burrell, D. Vetter, P. Hempel, P. Karczewski and E.-G. Krause (1999). "Activation of β_2 -adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure." Circulation **99**(1): 65-72.
- Kemi, M., K. P. Keenan, C. McCoy, C. M. Hoe, K. A. Soper, G. C. Ballam and M. J. van Zwieten (2000). "The relative protective effects of moderate dietary restriction versus dietary modification on spontaneous cardiomyopathy in male Sprague-Dawley rats." Toxicologic pathology **28**: 285-296.
- Kemnitz, J. W., E. B. Roecker, R. Weindruch, D. F. Elson, S. T. Baum and R. N. Bergman (1994). "Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys." The American journal of physiology **266**: E540-E547.
- Kim, J.-a., K. K. Koh and M. J. Quon (2005). "The union of vascular and metabolic actions of insulin in sickness and in health." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **25**: 889-891.

- Kim, J.-a., M. Montagnani, K. K. Koh and M. J. Quon (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." Circulation **113**: 1888-1904.
- Kim, Y. C. and M. B. Zemel (1993). "Insulin increases vascular smooth muscle recovery from intracellular calcium loads." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **22**: 74-77.
- Kirstein, M., J. Brett, S. Radoff, S. Ogawa, D. Stern and H. Vlassara (1990). "Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**: 9010-9014.
- Kobayashi, T., K. Taguchi, S. Nemoto, T. Nogami, T. Matsumoto and K. Kamata (2009). "Activation of the PDK-1/Akt/eNOS pathway involved in aortic endothelial function differs between hyperinsulinemic and insulin-deficient diabetic rats." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **297**: H1767-H1775.
- Koch, C. E., C. Lowe, K. Legler, J. Benzler, A. Boucsein, G. Böttiger, D. R. Grattan, L. M. Williams and A. Tups (2014). "Central adiponectin acutely improves glucose tolerance in male mice." Endocrinology **155**: 1806-1816.
- Kohan, D. E. and M. Barton (2014). "Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease." Kidney international **86**: 896-904.
- Kohan, D. E., N. F. Rossi, E. W. Inscho and D. M. Pollock (2011). "Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin." Physiological reviews **91**: 1-77.
- Kolettis, T. M., G. G. Baltogiannis, D. G. Tsalikakis, A. T. Tzallas, M. G. Agelaki, A. Fotopoulos, D. I. Fotiadis and Z. S. Kyriakides (2008). "Effects of dual endothelin receptor blockade on sympathetic activation and arrhythmogenesis during acute myocardial infarction in rats." European journal of pharmacology **580**: 241-249.
- Komatsumoto, S. and M. Nara (1995). "[Changes in the level of endothelin-1 with aging]." Nihon Ronen Igakkai zasshi. Japanese journal of geriatrics **32**: 664-669.
- Komuro, I., H. Kurihara, T. Sugiyama, M. Yoshizumi, F. Takaku and Y. Yazaki (1988). "Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells." FEBS letters **238**: 249-252.
- Korzick, D. H., J. M. Muller-Delp, P. Dougherty, C. L. Heaps, D. K. Bowles and K. K. Krick (2005). "Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C." Cardiovascular research **66**(2): 384-392.
- Korzick, D. H., J. M. Muller-Delp, P. Dougherty, C. L. Heaps, D. K. Bowles and K. K. Krick (2005). "Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C." Cardiovascular research **66**: 384-392.
- Krämer, B. K., T. W. Smith and R. A. Kelly (1991). "Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H⁺ exchanger." Circulation research **68**: 269-279.
- Krogh-Madsen, R., P. Plomgaard, T. Akerstrom, K. Møller, O. Schmitz and B. K. Pedersen (2008). "Effect of short-term intralipid infusion on the immune response during low-dose endotoxemia in humans." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **294**: E371-E379.
- Küng, C. F. and T. F. Lüscher (1995). "Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **25**: 194-200.
- Lakatta, E. G. (1993). "Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age." Physiological reviews **73**: 413-467.
- Lakatta, E. G. (2015). "So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease?" Journal of molecular and cellular cardiology **83**: 1-13.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107**: 139-146.

- Latronico, M. V. G., S. Costinean, M. L. Lavitrano, C. Peschle and G. Condorelli (2004). "Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes." Annals of the New York Academy of Sciences **1015**: 250-260.
- Leblanc, A. J., B. Chen, P. J. Dougherty, R. A. Reyes, R. D. Shipley, D. H. Korzick and J. M. Muller-Delp (2013). "Divergent effects of aging and sex on vasoconstriction to endothelin in coronary arterioles." Microcirculation (New York, N.Y. : 1994) **20**: 365-376.
- Lee, C.-K., D. B. Allison, J. Brand, R. Weindruch and T. A. Prolla (2002). "Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 14988-14993.
- Lee, H.-Y. and B.-H. Oh (2010). "Aging and arterial stiffness." Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society **74**: 2257-2262.
- Leite-Moreira, A. F. and C. Brás-Silva (2004). "Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **287**: H1194-H1199.
- Levin, E. R. (1995). "Endothelins." The New England journal of medicine **333**: 356-363.
- Li, Q.-X., Z.-Y. Xiong, B.-P. Hu, Z.-J. Tian, H.-F. Zhang, W.-Y. Gou, H.-C. Wang, F. Gao and Q.-J. Zhang (2009). "Aging-associated insulin resistance predisposes to hypertension and its reversal by exercise: the role of vascular vasorelaxation to insulin." Basic research in cardiology **104**: 269-284.
- Liepa, G. U., E. J. Masoro, H. A. Bertrand and B. P. Yu (1980). "Food restriction as a modulator of age-related changes in serum lipids." The American journal of physiology **238**: E253-E257.
- Lim, M., S. Honisett, C. D. Sparkes, P. Komesaroff, A. Kompa and H. Krum (2004). "Differential effect of urotensin II on vascular tone in normal subjects and patients with chronic heart failure." Circulation **109**: 1212-1214.
- Lindeman, R. D. (1990). "Overview: renal physiology and pathophysiology of aging." American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation **16**: 275-282.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods (San Diego, Calif.) **25**: 402-408.
- Löhn, M., G. Dubrovskaja, B. Lauterbach, F. C. Luft, M. Gollasch and A. M. Sharma (2002). "Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **16**: 1057-1063.
- London, G., A. Covic, D. Goldsmith, A. Wiecek, G. Suleymanlar, A. Ortiz, Z. Massy, B. Lindholm, A. Martinez-Castelao, D. Fliser, R. Agarwal, K. J. Jager, F. W. Dekker, P. J. Blankestijn, C. Zoccali, f. E. RENal, C. M. working group of the European Renal Association-European Dialysis and T. A. (2011). "Arterial aging and arterial disease: interplay between central hemodynamics, cardiac work, and organ flow-implications for CKD and cardiovascular disease." Kidney international supplements **1**: 10-12.
- Lopes, W. A., N. Leite, L. R. da Silva, D. T. Brunelli, A. F. Gáspari, R. B. Radominski, M. P. T. Chacon-Mikahil and C. R. Cavaglieri (2016). "Effects of 12 weeks of combined training without caloric restriction on inflammatory markers in overweight girls." Journal of sports sciences **34**: 1902-1912.
- López-Lluch, G. and P. Navas (2016). "Calorie restriction as an intervention in ageing." The Journal of physiology **594**: 2043-2060.
- López Farré, A., A. Riesco, G. Espinosa, E. Digiuni, M. R. Cernadas, V. Alvarez, M. Montón, F. Rivas, M. J. Gallego and J. Egido (1993). "Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart." Circulation **88**: 1166-1171.

- Lüscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." Circulation **102**: 2434-2440.
- MacCarthy, P. A., R. Grocott-Mason, B. D. Prendergast and A. M. Shah (2000). "Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ET(A) receptor antagonist." Circulation **101**: 142-147.
- Macdonald, I. A. (2016). "A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes." European journal of nutrition **55**: 17-23.
- MacDonald, P. E. and M. B. Wheeler (2003). "Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets." Diabetologia **46**: 1046-1062.
- MacIntyre, J. N., J. E. Slusar, J. Zhu, A. X. Dong, S. E. Howlett and M. E. Kelly (2012). "Age-associated alterations in retinal arteriole reactivity to endothelin-1 differ between the sexes." Mechanisms of ageing and development **133**: 611-619.
- Maczewski, M. and A. Beresewicz (2000). "The role of endothelin, protein kinase C and free radicals in the mechanism of the post-ischemic endothelial dysfunction in guinea-pig hearts." Journal of molecular and cellular cardiology **32**: 297-310.
- Maier, S., F. Aulbach, A. Simm, V. Lange, H. Langenfeld, H. Behre, U. Kersting, U. Walter and M. Kirstein (1999). "Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin." Cardiovascular research **44**: 390-397.
- Marini, M., S. Carpi, A. Bellini, F. Patalano and S. Mattoli (1996). "Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells." Biochemical and biophysical research communications **220**: 896-899.
- Martins, I., L. Galluzzi and G. Kroemer (2011). "Hormesis, cell death and aging." Aging **3**: 821-828.
- Masoro, E. J. (2000). "Caloric restriction and aging: an update." Experimental gerontology **35**: 299-305.
- Masoro, E. J., H. Bertrand, G. Liepa and B. P. Yu (1979). Analysis and exploration of age-related changes in mammalian structure and function. Federation proceedings.
- Masoro, E. J., R. J. McCarter, M. S. Katz and C. A. McMahan (1992). "Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use." Journal of gerontology **47**: B202-B208.
- Masson, S., L. Staszewsky, G. Annoni, E. Carlo, B. Arosio, A. Bai, C. Calabresi, E. Martinoli, M. Salio, F. Fiordaliso, E. Scanziani, A. E. Rudolph and R. Latini (2004). "Eplerenone, a selective aldosterone blocker, improves diastolic function in aged rats with small-to-moderate myocardial infarction." Journal of cardiac failure **10**: 433-441.
- Masternak, M. M., K. A. Al-Regaiey, M. M. Del Rosario Lim, V. Jimenez-Ortega, J. A. Panici, M. S. Bonkowski, J. J. Kopchick, Z. Wang and A. Bartke (2006). "Caloric restriction and growth hormone receptor knockout: effects on expression of genes involved in insulin action in the heart." Experimental gerontology **41**: 417-429.
- McAuley, M. T. and K. M. Mooney (2014). "Lipid metabolism and hormonal interactions: impact on cardiovascular disease and healthy aging." Expert Review of Endocrinology & Metabolism **9**(4): 357-367.
- McCarthy, A. M. and J. S. Elmendorf (2007). "GLUT4's itinerary in health & disease." Indian Journal of Medical Research **125**(3): 373.
- McCay, C. M., M. F. Crowell and L. A. Maynard (1935). "The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size one figure." The journal of Nutrition **10**(1): 63-79.
- McCurdy, C. E. and G. D. Cartee (2005). "Akt2 is essential for the full effect of calorie restriction on insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle." Diabetes **54**: 1349-1356.
- McDowell, S. A., E. McCall, W. F. Matter, T. B. Estridge and C. J. Vlahos (2004). "Phosphoinositide 3-kinase regulates excitation-contraction coupling in neonatal

- cardiomyocytes." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **286**: H796-H805.
- McKiernan, S. H., R. J. Colman, M. Lopez, T. M. Beasley, J. M. Aiken, R. M. Anderson and R. Weindruch (2011). "Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle." Experimental gerontology **46**: 23-29.
- McNulty, P. H., S. Pfau and L. I. Deckelbaum (2000). "Effect of plasma insulin level on myocardial blood flow and its mechanism of action." The American journal of cardiology **85**: 161-165.
- McQueen, A. P., D. Zhang, P. Hu, L. Swenson, Y. Yang, V. G. Zaha, J. L. Hoffman, U. J. Yun, G. Chakrabarti, Z. Wang, K. H. Albertine, E. D. Abel and S. E. Litwin (2005). "Contractile dysfunction in hypertrophied hearts with deficient insulin receptor signaling: possible role of reduced capillary density." Journal of molecular and cellular cardiology **39**: 882-892.
- Meijer, R. I., W. Bakker, C.-L. A. F. Alta, P. Sipkema, J. S. Yudkin, B. Viollet, E. A. Richter, Y. M. Smulders, V. W. M. van Hinsbergh, Sern\`e, Erik H. and others (2013). "Perivascular adipose tissue control of insulin-induced vasoreactivity in muscle is impaired in db/db mice." Diabetes **62**(2): 590-598.
- Meyer, M. R., M. Barton and E. R. Prossnitz (2014). "Functional heterogeneity of NADPH oxidase-mediated contractions to endothelin with vascular aging." Life sciences **118**: 226-231.
- Meyer, M. R., M. Barton and E. R. Prossnitz (2014). "Functional heterogeneity of NADPH oxidase-mediated contractions to endothelin with vascular aging." Life sciences **118**(2): 226-231.
- Michaud, M., L. Balardy, G. Moulis, C. Gaudin, C. Peyrot, B. Vellas, M. Cesari and F. Nourhashemi (2013). "Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases." Journal of the American Medical Directors Association **14**: 877-882.
- Miele, C., A. Riboulet, M. A. Maitan, F. Oriente, C. Romano, P. Formisano, J. Giudicelli, F. Beguinot and E. Van Obberghen (2003). "Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism." The Journal of biological chemistry **278**: 47376-47387.
- Miles, P. D., M. Levisetti, D. Reichart, M. Khoursheed, A. R. Moossa and J. M. Olefsky (1995). "Kinetics of insulin action in vivo. Identification of rate-limiting steps." Diabetes **44**: 947-953.
- Mimaki, Y., H. Kawasaki, M. Okazaki, A. Nakatsuma, H. Araki and Y. Gomita (1998). "Involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in insulin-induced vasodilatation in mesenteric resistance blood vessels of rats." British journal of pharmacology **123**(8): 1684-1690.
- Minamiyama, Y., Y. Bito, S. Takemura, Y. Takahashi, S. Kodai, S. Mizuguchi, Y. Nishikawa, S. Suehiro and S. Okada (2007). "Calorie restriction improves cardiovascular risk factors via reduction of mitochondrial reactive oxygen species in type II diabetic rats." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **320**: 535-543.
- Miranda, K. M., M. G. Espey and D. A. Wink (2001). "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite." Nitric oxide : biology and chemistry **5**: 62-71.
- Miyaki, A., S. Maeda, M. Yoshizawa, M. Misono, Y. Saito, H. Sasai, T. Endo, Y. Nakata, K. Tanaka and R. Ajisaka (2009). "Effect of weight reduction with dietary intervention on arterial distensibility and endothelial function in obese men." Angiology **60**: 351-357.
- Miyauchi, T., M. Yanagisawa, K. Iida, R. Ajisaka, N. Suzuki, M. Fujino, K. Goto, T. Masaki and Y. Sugishita (1992). "Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects." American heart journal **123**: 1092-1093.

- Molinari, C., A. Battaglia, G. Bona, E. Grossini, D. A. S. G. Mary, P. Ruggeri, J. B. Stoker and G. Vacca (2001). "Mechanisms of the renal vasodilation caused by insulin in anesthetized pigs." Life sciences **69**(14): 1699-1708.
- Møller, N., L. Gormsen, J. Fuglsang and J. Gjedsted (2003). "Effects of ageing on insulin secretion and action." Hormone research **60**: 102-104.
- Montagnani, M., H. Chen, V. A. Barr and M. J. Quon (2001). "Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser1179." Journal of Biological Chemistry **276**(32): 30392-30398.
- Montagnani, M., L. V. Ravichandran, H. Chen, D. L. Esposito and M. J. Quon (2002). "Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells." Molecular endocrinology **16**(8): 1931-1942.
- Mount, P. F., B. E. Kemp and D. A. Power (2007). "Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation." Journal of molecular and cellular cardiology **42**(2): 271-279.
- Mozaffarian, D. (2007). "Free fatty acids, cardiovascular mortality, and cardiometabolic stress." European heart journal **28**: 2699-2700.
- Mueckler, M. (1994). "Facilitative glucose transporters." European journal of biochemistry **219**: 713-725.
- Muniyappa, R., M. Montagnani, K. K. Koh and M. J. Quon (2007). "Cardiovascular actions of insulin." Endocrine reviews **28**: 463-491.
- Muniyappa, R., M. F. Walsh and J. R. Sowers (1997). "The role of IGF-1 and the effects of insulin on the vascular wall." NUTRITION METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES **7**(2): 86-91.
- Murawski, U., K. Kriesten and H. Egge (1989). "Age-related changes of lipid fractions and total fatty acids in the serum of female and male rats aged from 37 to 1200 days." Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry **94**: 525-536.
- Murthy, V. K., O. A. Oredipe, M. R. Stiles and J. C. Shipp (1986). "Increased fatty acid uptake, a factor in increased hepatic triacylglycerol synthesis in aging rats." Mechanisms of ageing and development **37**: 49-54.
- Musicki, B. and A. L. Burnett (2007). "Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction." International journal of impotence research **19**: 129-138.
- Nakashima, M. and P. M. Vanhoutte (1996). "Decreased endothelium-dependent hyperpolarization with aging and hypertension in the rat mesenteric artery." Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. Harwood Academic, Amsterdam.
- Namekata, I., S. Fujiki, Y. Kawakami, R. Moriwaki, K. Takeda, T. Kawanishi, A. Takahara, K. Shigenobu and H. Tanaka (2008). "Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium." Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology **376**: 385-395.
- Naruse, K., C. Rask-Madsen, N. Takahara, S.-w. Ha, K. Suzuma, K. J. Way, J. R. C. Jacobs, A. C. Clermont, K. Ueki, Y. Ohshiro, J. Zhang, A. B. Goldfine and G. L. King (2006). "Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance." Diabetes **55**: 691-698.
- Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Regulation of biosynthesis of nitric oxide." J Biol Chem **269**(19).
- Niccoli, T. and L. Partridge (2012). "Ageing as a risk factor for disease." Current biology : CB **22**: R741-R752.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino and M. Brownlee (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature **404**: 787-790.

- North, B. J. and D. A. Sinclair (2012). "The intersection between aging and cardiovascular disease." Circulation research **110**: 1097-1108.
- Nosalski, R. and T. J. Guzik (2017). "Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease." British journal of pharmacology.
- Nyberg, M., S. P. Mortensen and Y. Hellsten (2013). "Physical activity opposes the age-related increase in skeletal muscle and plasma endothelin-1 levels and normalizes plasma endothelin-1 levels in individuals with essential hypertension." Acta physiologica (Oxford, England) **207**: 524-535.
- Nyberg, M., S. P. Mortensen and Y. Hellsten (2013). "Physical activity opposes the age-related increase in skeletal muscle and plasma endothelin-1 levels and normalizes plasma endothelin-1 levels in individuals with essential hypertension." Acta physiologica **207**(3): 524-535.
- Nystrom, F. H. and M. J. Quon (1999). "Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity." Cellular signalling **11**: 563-574.
- Oie, E., L. E. Vinge, T. Tønnessen, H. K. Grøgaard, H. Kjekshus, G. Christensen, O. A. Smiseth and H. Attramadal (1997). "Transient, isopeptide-specific induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure in rats." The American journal of physiology **273**: H1727-H1736.
- Olver, T. D., M. W. McDonald, D. Klakotskaia, R. A. Richardson, J. L. Jasperse, C. W. J. Melling, T. R. Schachtman, H. T. Yang, C. A. Emter and M. H. Laughlin (2017). "A chronic physical activity treatment in obese rats normalizes the contributions of ET-1 and NO to insulin-mediated posterior cerebral artery vasodilation." Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) **122**: 1040-1050.
- Ong, K. L., L. Y. F. Wong, Y. B. Man, R. Y. H. Leung, Y.-Q. Song, K. S. L. Lam and B. M. Y. Cheung (2006). "Haplotypes in the urotensin II gene and urotensin II receptor gene are associated with insulin resistance and impaired glucose tolerance." Peptides **27**: 1659-1667.
- Opalach, K., S. Rangaraju, I. Madorsky, C. Leeuwenburgh and L. Notterpek (2010). "Lifelong calorie restriction alleviates age-related oxidative damage in peripheral nerves." Rejuvenation research **13**: 65-74.
- Ortmann, J., K. Amann, R. P. Brandes, M. Kretzler, n. M\"u, Klaus, N. Parekh, T. Traupe, M. Lange, T. Lattmann and M. Barton (2004). "Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition." Hypertension **44**(6): 974-981.
- Ouwens, D. M., C. Boer, M. Fodor, P. de Galan, R. J. Heine, J. A. Maassen and M. Diamant (2005). "Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats." Diabetologia **48**: 1229-1237.
- Ouzounian, M., D. S. Lee and P. P. Liu (2008). "Diastolic heart failure: mechanisms and controversies." Nature clinical practice. Cardiovascular medicine **5**: 375-386.
- Padilla, J., N. T. Jenkins, V. J. Vieira-Potter and M. H. Laughlin (2013). "Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **304**: R543-R552.
- Palou, M., J. Sánchez, T. Priego, A. M. Rodríguez, C. Picó and A. Palou (2010). "Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding." The Journal of nutritional biochemistry **21**: 23-33.
- Park, S. Y., G. H. Choi, H. I. Choi, J. Ryu, C. Y. Jung and W. Lee (2005). "Calorie restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats." Archives of biochemistry and biophysics **436**: 276-284.
- Pasceri, V., J. T. Willerson and E. T. Yeh (2000). "Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells." Circulation **102**: 2165-2168.

- Patti, M. E. and C. R. Kahn (1998). "The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action." Journal of basic and clinical physiology and pharmacology **9**: 89-109.
- Peifley, K. A. and J. A. Winkles (1998). "Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells." Biochemical and biophysical research communications **242**: 202-208.
- Pieske, B., B. Beyermann, V. Breu, B. M. Löffler, K. Schlotthauer, L. S. Maier, S. Schmidt-Schweda, H. Just and G. Hasenfuss (1999). "Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium." Circulation **99**: 1802-1809.
- Pittman, I., L. Philipson and D. Steiner (2004). "Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships." Endotext. com.
- Piuhola, J., k. M^a, Markus, I. Szokodi and H. Ruskoaho (2003). "Dual role of endothelin-1 via ETA and ETB receptors in regulation of cardiac contractile function in mice." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **285**(1): H112-H118.
- Poornima, I. G., P. Parikh and R. P. Shannon (2006). "Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis." Circulation research **98**: 596-605.
- Potenza, M. A., F. L. Marasciulo, D. M. Chieppa, G. S. Brigiani, G. Formoso, M. J. Quon and M. Montagnani (2005). "Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **289**: H813-H822.
- Quehenberger, P., A. Bierhaus, P. Fasching, C. Muellner, M. Klevesath, M. Hong, G. Stier, M. Sattler, E. Schleicher, W. Speiser and P. P. Nawroth (2000). "Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells." Diabetes **49**: 1561-1570.
- Rask-Madsen, C. and C. R. Kahn (2012). "Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **32**: 2052-2059.
- Rattan, S. I. S. (2014). "Aging is not a disease: implications for intervention." Aging and disease **5**: 196-202.
- Reaven, G. (2004). "The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals." Endocrinology and metabolism clinics of North America **33**: 283-303.
- Ren, J., J. R. Sowers, M. Natavio and R. A. Brown (1999). "Influence of age on inotropic response to insulin and insulin-like growth factor I in spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **221**: 46-52.
- Ren, J., M. F. Walsh, M. Hamaty, J. R. Sowers and R. A. Brown (1999). "Augmentation of the inotropic response to insulin in diabetic rat hearts." Life sciences **65**: 369-380.
- Reuben, D. B., A. I. Cheh, T. B. Harris, L. Ferrucci, J. W. Rowe, R. P. Tracy and T. E. Seeman (2002). "Peripheral blood markers of inflammation predict mortality and functional decline in high-functioning community-dwelling older persons." Journal of the American Geriatrics Society **50**: 638-644.
- Reusch, J. E., P. Bhuripanyo, K. Carel, J. W. Leitner, P. Hsieh, D. DePaolo and B. Draznin (1995). "Differential requirement for p21ras activation in the metabolic signaling by insulin." The Journal of biological chemistry **270**: 2036-2040.
- Reyes, J. A. O. and A. A. Plancarte (2008). "Bases moleculares de las acciones de la insulina." Revista de Educación Bioquímica **27**(1): 9-18.

- Rippe, C., L. Lesniewski, M. Connell, T. LaRocca, A. Donato and D. Seals (2010). "Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress." Aging cell **9**: 304-312.
- Rippe, C., L. Lesniewski, M. Connell, T. LaRocca, A. Donato and D. Seals (2010). "Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress." Aging cell **9**(3): 304-312.
- Roden, M., T. B. Price, G. Perseghin, K. F. Petersen, D. L. Rothman, G. W. Cline and G. I. Shulman (1996). "Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans." The Journal of clinical investigation **97**: 2859-2865.
- Rojas, A., S. Romay, D. González, B. Herrera, R. Delgado and K. Otero (2000). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products." Circulation research **86**: E50-E54.
- Rossi, A. P., F. Fantin, G. A. Zamboni, G. Mazzali, C. A. Rinaldi, M. Del Giglio, V. Di Francesco, M. Barillari, R. Pozzi Mucelli and M. Zamboni (2011). "Predictors of ectopic fat accumulation in liver and pancreas in obese men and women." Obesity (Silver Spring, Md.) **19**: 1747-1754.
- Rossi, G. P., T. M. Seccia and G. G. Nussdorfer (2001). "Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system." International review of cytology **209**: 241-272.
- Rota, M., A. Boni, K. Urbanek, M. E. Padin-Iruegas, T. J. Kajstura, G. Fiore, H. Kubo, E. H. Sonnenblick, E. Musso, S. R. Houser, A. Leri, M. A. Sussman and P. Anversa (2005). "Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility." Circulation research **97**: 1332-1341.
- Rubanyi, G. M. and P. M. Vanhoutte (1985). "Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium." The Journal of physiology **364**: 45-56.
- Rubio, M. E., G. Baños, E. Díaz and V. Guarner (2006). "Effect of age on insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats." Experimental gerontology **41**: 282-288.
- Safar, H., A. Chahwakilian, Y. Boudali, S. Debray-Meignan, M. Safar and J. Blacher (2006). "Arterial stiffness, isolated systolic hypertension, and cardiovascular risk in the elderly." The American journal of geriatric cardiology **15**: 178-182; quiz 183.
- Saito, F., M. T. Hori, M. Fittingoff, T. Hino and M. L. Tuck (1993). "Insulin attenuates agonist-mediated calcium mobilization in cultured rat vascular smooth muscle cells." The Journal of clinical investigation **92**: 1161-1167.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**: 799-806.
- Sármán, B., M. Tóth and A. Somogyi (1998). "Role of endothelin-1 in diabetes mellitus." Diabetes/metabolism reviews **14**: 171-175.
- Scherrer, U. and C. Sartori (1997). "Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity." Circulation **96**: 4104-4113.
- Schiffrin, E. L. (2014). "Immune mechanisms in hypertension and vascular injury." Clinical science (London, England : 1979) **126**: 267-274.
- Schmidt, A. M., O. Hori, J. Brett, S. D. Yan, J. L. Wautier and D. Stern (1994). "Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions." Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology **14**: 1521-1528.
- Schnyder, B., M. Pittet, J. Durand and S. Schnyder-Candrian (2002). "Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **282**: E87-E94.

- Schulman, I. H., M.-S. Zhou, E. A. Jaimes and L. Raij (2007). "Dissociation between metabolic and vascular insulin resistance in aging." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **293**: H853-H859.
- Segal, S. S. (2005). "Regulation of blood flow in the microcirculation." Microcirculation (New York, N.Y. : 1994) **12**: 33-45.
- Seo, B. and T. F. Lüscher (1995). "ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in renal artery of aging SHR. Effects of FR139317 and bosentan." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **25**: 501-506.
- Sequea, D. A., N. Sharma, E. B. Arias and G. D. Cartee (2012). "Calorie restriction enhances insulin-stimulated glucose uptake and Akt phosphorylation in both fast-twitch and slow-twitch skeletal muscle of 24-month-old rats." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **67**: 1279-1285.
- Serrano, R., M. Villar, N. Gallardo, J. M. Carrascosa, C. Martinez and A. Andrés (2009). "The effect of aging on insulin signalling pathway is tissue dependent: central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging." Mechanisms of ageing and development **130**: 189-197.
- Sertié, R. A. L., R. d. O. Caminhotto, S. Andreotti, A. B. Campaña, A. R. G. de Proença, N. C. de Castro and F. B. Lima (2015). "Metabolic adaptations in the adipose tissue that underlie the body fat mass gain in middle-aged rats." Age (Dordrecht, Netherlands) **37**: 87.
- Shafir, E., E. Ziv and L. Mosthaf (1999). "Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models." Annals of the New York Academy of Sciences **892**: 223-246.
- Shah, R. (2007). "Endothelins in health and disease." European journal of internal medicine **18**: 272-282.
- Sharifi, A. M., S. Mohseni, S. Nekoparvar, B. Larijani, H. Fakhrzadeh and S. Oryan (2008). "Effect of caloric restriction on nitric oxide production, ACE activity, and blood pressure regulation in rats." Acta physiologica Hungarica **95**: 55-63.
- Sherman, H., I. Frumin, R. Gutman, N. Chapnik, A. Lorentz, J. Meylan, J. le Coutre and O. Froy (2011). "Long-term restricted feeding alters circadian expression and reduces the level of inflammatory and disease markers." Journal of cellular and molecular medicine **15**: 2745-2759.
- Shimizu, S., M. Ishii, T. Yamamoto, T. Kawanishi, K. Momose and Y. Kuroiwa (1994). "Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells." Research communications in chemical pathology and pharmacology **84**: 301-314.
- Shinmura, K., K. Tamaki and R. Bolli (2005). "Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K⁺ channels in both young and aged hearts." Journal of molecular and cellular cardiology **39**: 285-296.
- Shinmura, K., K. Tamaki, K. Saito, Y. Nakano, T. Tobe and R. Bolli (2007). "Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase." Circulation **116**: 2809-2817.
- Shinmura, K., K. Tamaki, M. Sano, M. Murata, H. Yamakawa, H. Ishida and K. Fukuda (2011). "Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging." Journal of molecular and cellular cardiology **50**: 117-127.
- Shipley, R. D. and J. M. Muller-Delp (2005). "Aging decreases vasoconstrictor responses of coronary resistance arterioles through endothelium-dependent mechanisms." Cardiovascular Research **66**(2): 374-383.
- Shivakumar, K., D. E. Dostal, K. Boheler, K. M. Baker and E. G. Lakatta (2003). "Differential response of cardiac fibroblasts from young adult and senescent rats to ANG II." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **284**: H1454-H1459.

- Sierra Rojas, J. X., M. García-San Frutos, D. Horrillo, N. Lauzurica, E. Oliveros, J. M. Carrascosa, T. Fernández-Agulló and M. Ros (2016). "Differential Development of Inflammation and Insulin Resistance in Different Adipose Tissue Depots Along Aging in Wistar Rats: Effects of Caloric Restriction." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **71**: 310-322.
- Sinclair, D. A. (2005). "Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation." Mechanisms of ageing and development **126**: 987-1002.
- Slot, J. W., H. J. Geuze, S. Gigengack, D. E. James and G. E. Lienhard (1991). "Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**: 7815-7819.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." Science (New York, N.Y.) **273**: 59-63.
- Soltis, E. E. and L. A. Cassis (1991). "Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness." Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice **13**: 277-296.
- Sondermeijer, B., A. Kompa, P. Komesaroff and H. Krum (2005). "Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension." American journal of hypertension **18**: 1195-1199.
- Spaulding, C. C., R. L. Walford and R. B. Effros (1997). "Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice." Mechanisms of ageing and development **93**: 87-94.
- Standley, P. R., F. Zhang, J. L. Ram, M. B. Zemel and J. R. Sowers (1991). "Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transients and a voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells." Journal of Clinical Investigation **88**(4): 1230.
- Stankovic, M., D. Mladenovic, M. Ninkovic, D. Vucevic, T. Tomasevic and T. Radosavljevic (2013). "Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters." General physiology and biophysics **32**: 277-283.
- Stehr, S. N., A. Pexa, S. Hannack, A. Heintz, A. R. Heller, A. Deussen, T. Koch and M. Hübner (2007). "Insulin effects on myocardial function and bioenergetics in L-bupivacaine toxicity in the isolated rat heart." European journal of anaesthesiology **24**: 340-346.
- Steinberg, H. O. and A. D. Baron (2002). "Vascular function, insulin resistance and fatty acids." Diabetologia **45**: 623-634.
- Stepniakowski, K. T., T. L. Goodfriend and B. M. Egan (1995). "Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic sensitivity." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **25**: 774-778.
- Stevanovic, D., V. Starcevic, U. Vilimanovich, D. Nesic, L. Vucicevic, M. Misirkic, K. Janjetovic, E. Savic, D. Popadic, E. Sudar, D. Micic, M. Sumarac-Dumanovic and V. Trajkovic (2012). "Immunomodulatory actions of central ghrelin in diet-induced energy imbalance." Brain, behavior, and immunity **26**: 150-158.
- Subramaniam, G., F. I. Achike and M. R. Mustafa (2009). "Characterizing the mechanisms of insulin vasodilatation of normal and streptozotocin-induced diabetic rat aorta." Journal of cardiovascular pharmacology **53**: 333-340.
- Sun, H., B.-G. Kerfant, D. Zhao, M. G. Trivieri, G. Y. Oudit, J. M. Penninger and P. H. Backx (2006). "Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca²⁺ currents via increased PI3Kalpha/PKB signaling." Circulation research **98**: 1390-1397.
- Sundell, J., H. Laine, P. Nuutila, T. Rönnemaa, M. Luotolahti, O. Raitakari and J. Knuuti (2002). "The effects of insulin and short-term hyperglycaemia on myocardial blood flow in young men with uncomplicated Type I diabetes." Diabetologia **45**: 775-782.
- Sung, M. M. Y., C.-L. M. Soltys, G. Masson, J. J. Boisvenue and J. R. B. Dyck (2011). "Improved cardiac metabolism and activation of the RISK pathway contributes to improved

- post-ischemic recovery in calorie restricted mice." Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) **89**: 291-302.
- Syed Ikmal, S. I. Q., H. Zaman Huri, S. R. Vethakkan and W. A. Wan Ahmad (2013). "Potential biomarkers of insulin resistance and atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease." International journal of endocrinology **2013**: 698567.
- Taddei, S., A. Virdis, L. Ghiadoni, G. Salvetti, G. Bernini, A. Magagna and A. Salvetti (2001). "Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **38**: 274-279.
- Taegtmeyer, H. (1994). "Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications." Current problems in cardiology **19**: 59-113.
- Taffet, G. E., T. T. Pham and C. J. Hartley (1997). "The age-associated alterations in late diastolic function in mice are improved by caloric restriction." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **52**: B285-B290.
- Takahashi, S., J. Masuda, H. Shimagami, Y. Ohta, T. Kanda, K. Saito and H. Kato (2011). "Mild caloric restriction up-regulates the expression of prohibitin: a proteome study." Biochemical and biophysical research communications **405**: 462-467.
- Takahashi, S. and M. E. Mendelsohn (2003). "Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex." The Journal of biological chemistry **278**: 30821-30827.
- Takanashi, M. and M. Endoh (1991). "Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium." The American journal of physiology **261**: H611-H619.
- Teng, X., H. Zhang, C. Snead and J. D. Catravas (2002). "Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells." American journal of physiology. Cell physiology **282**: C144-C152.
- Tessari, P. (2000). "Changes in protein, carbohydrate, and fat metabolism with aging: possible role of insulin." Nutrition reviews **58**: 11-19.
- Thorin, E. and M. Clozel (2010). "The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1." Advances in pharmacology (San Diego, Calif.) **60**: 1-26.
- Tirupattur, P. R., J. L. Ram, P. R. Standley and J. R. Sowers (1993). "Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase gene expression by insulin in vascular smooth muscle cells." American journal of hypertension **6**: 626-629.
- Tolins, J. P., P. J. Shultz and L. Raij (1991). "Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of vascular tone and remodeling. Update on humoral regulation of vascular tone." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **17**: 909-916.
- Torlińska, T., P. Maćkowiak, L. Nogowski, T. Hryniewiecki, H. Witmanowski, M. Perz, E. M dry and K. W. Nowak (2000). "Age dependent changes of insulin receptors in rat tissues." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society **51**: 871-881.
- Toth, P. P. (2014). "Insulin resistance, small LDL particles, and risk for atherosclerotic disease." Current vascular pharmacology **12**: 653-657.
- Touyz, R. M. (2004). "Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?" Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **44**: 248-252.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (1996). "Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium ([Ca²⁺]_i) transients in vascular smooth muscle cells." Hypertension (Dallas, Tex. : 1979) **27**: 1097-1103.
- Trovati, M., P. Massucco, L. Mattiello, F. Cavalot, E. Mularoni, A. Hahn and G. Anfossi (1995). "Insulin increases cyclic nucleotide content in human vascular smooth muscle cells:

a mechanism potentially involved in insulin-induced modulation of vascular tone." *Diabetologia* **38**: 936-941.

Trovati, M., P. Massucco, L. Mattiello, C. Costamagna, E. Aldieri, F. Cavalot, G. Anfossi, A. Bosia and D. Ghigo (1999). "Human vascular smooth muscle cells express a constitutive nitric oxide synthase that insulin rapidly activates, thus increasing guanosine 3':5'-cyclic monophosphate and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentrations." *Diabetologia* **42**: 831-839.

Tschritter, O., A. Fritsche, C. Thamer, M. Haap, F. Shirkavand, S. Rahe, H. Staiger, E. Maerker, H. Häring and M. Stumvoll (2003). "Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism." *Diabetes* **52**: 239-243.

Tsioufis, C., K. Dimitriadis, M. Selima, C. Thomopoulos, C. Mihas, I. Skiadas, D. Tousoulis, C. Stefanadis and I. Kallikazaros (2007). "Low-grade inflammation and hypoadiponectinaemia have an additive detrimental effect on aortic stiffness in essential hypertensive patients." *European heart journal* **28**: 1162-1169.

Ungvari, Z., Z. Orosz, N. Labinskyy, A. Rivera, Z. Xiangmin, K. Smith and A. Csiszar (2007). "Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-kappaB activation in aged rat arteries." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **293**: H37-H47.

Ungvari, Z., C. Parrado-Fernandez, A. Csiszar and R. de Cabo (2008). "Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging." *Circulation research* **102**: 519-528.

Van Guilder, G. P., C. M. Westby, J. J. Greiner, B. L. Stauffer and C. A. DeSouza (2007). "Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise." *Hypertension* **50**(2): 403-409.

Vanhoutte, P. M. (1989). "Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **13**: 658-667.

Vanhoutte, P. M. and E. H. C. Tang (2008). "Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!" *The Journal of physiology* **586**(22): 5295-5304.

Venugopal, S. K., S. Devaraj, I. Yuhanna, P. Shaul and I. Jialal (2002). "Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells." *Circulation* **106**: 1439-1441.

Verdery, R. B. and R. L. Walford (1998). "Changes in plasma lipids and lipoproteins in humans during a 2-year period of dietary restriction in Biosphere 2." *Archives of internal medicine* **158**: 900-906.

Verlohren, S., G. Dubrovskaya, S.-Y. Tsang, K. Essin, F. C. Luft, Y. Huang and M. Gollasch (2004). "Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **44**: 271-276.

Vicent, D., J. Ilany, T. Kondo, K. Naruse, S. J. Fisher, Y. Y. Kisanuki, S. Bursell, M. Yanagisawa, G. L. King and C. R. Kahn (2003). "The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance." *The Journal of clinical investigation* **111**: 1373-1380.

Victorio, J. A., M. T. Fontes, L. V. Rossoni and A. P. Davel (2016). "Different anti-contractile function and nitric oxide production of thoracic and abdominal perivascular adipose tissues." *Frontiers in Physiology* **7**.

Vincent, M. A., E. J. Barrett, J. R. Lindner, M. G. Clark and S. Rattigan (2003). "Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **285**: E123-E129.

Vitousek, K. M., J. A. Gray and K. M. Grubbs (2004). "Caloric restriction for longevity: I. Paradigm, protocols and physiological findings in animal research." *European Eating Disorders Review* **12**(5): 279-299.

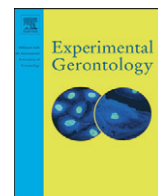
- Volek, J. S., M. L. Fernandez, R. D. Feinman and S. D. Phinney (2008). "Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome." Progress in lipid research **47**: 307-318.
- Volpato, S., J. M. Guralnik, L. Ferrucci, J. Balfour, P. Chaves, L. P. Fried and T. B. Harris (2001). "Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study." Circulation **103**: 947-953.
- von Essen, R., R. Ostermaier, E. Grube, W. Mäurer, U. Tebbe, R. Erbel, M. Roth, W. Oel, J. Brom and G. Weidinger (1997). "Effects of octreotide treatment on restenosis after coronary angioplasty: results of the VERAS study. VErringerung der Restenoserate nach Angioplastie durch ein Somatostatin-analogon." Circulation **96**: 1482-1487.
- von Lewinski, D., S. Bruns, S. Walther, H. Kögler and B. Pieske (2005). "Insulin causes [Ca²⁺]_i-dependent and [Ca²⁺]_i-independent positive inotropic effects in failing human myocardium." Circulation **111**: 2588-2595.
- Walford, R. L., S. B. Harris and M. W. Gunion (1992). "The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 11533-11537.
- Walford, R. L., D. Mock, R. Verdery and T. MacCallum (2002). "Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period." The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **57**: B211-B224.
- Wan, X.-D., W.-B. Yang, Y.-Z. Xia, J.-F. Wang, T. Lu and X.-M. Wang (2009). "Disruption of glucose homeostasis and induction of insulin resistance by elevated free fatty acids in human L02 hepatocytes." Journal of endocrinological investigation **32**: 454-459.
- Wang, C.-H., S.-H. Li, R. D. Weisel, P. W. M. Fedak, A. S. Dumont, P. Szmitko, R.-K. Li, D. A. G. Mickle and S. Verma (2003). "C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle." Circulation **107**: 1783-1790.
- Wang, J. X., G. Paik and J. P. Morgan (1991). "Endothelin 1 enhances myofilament Ca²⁺-responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium." Circulation research **69**: 582-589.
- Wang, M., J. Zhang, S. J. Walker, R. Dworakowski, E. G. Lakatta and A. M. Shah (2010). "Involvement of NADPH oxidase in age-associated cardiac remodeling." Journal of molecular and cellular cardiology **48**: 765-772.
- Wang, X. L., L. Zhang, K. Youker, M.-X. Zhang, J. Wang, S. A. LeMaire, J. S. Coselli and Y. H. Shen (2006). "Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase." Diabetes **55**: 2301-2310.
- Wang, Y., Z. Tian, W. Zang, H. Jiang, Y. Li, S. Wang and S. Chen (2015). "Exercise training reduces insulin resistance in postmyocardial infarction rats." Physiological reports **3**.
- Wang, Z. Q., A. D. Bell-Farrow, W. Sonntag and W. T. Cefalu (1997). "Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats." Experimental gerontology **32**: 671-684.
- Watanabe, S., T. Tagawa, K. Yamakawa, M. Shimabukuro and S. Ueda (2005). "Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **25**: 2376-2380.
- Wei, J. Y. (1992). "Age and the cardiovascular system." The New England journal of medicine **327**: 1735-1739.
- Weiss, E. P. and L. Fontana (2011). "Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **301**(4): H1205-H1219.

- Weiss, E. P. and L. Fontana (2011). "Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **301**: H1205-H1219.
- White, M. F. (2015). "Longevity: Mapping the path to a longer life." Nature **524**(7564): 170.
- Wiecha, J., K. Reineker, M. Reitmayer, R. Voisard, A. Hannekum, T. Mattfeldt, J. Waltenberger and V. Hombach (1998). "Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human vascular cells by insulin and basic fibroblast growth factor." Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society **8**: 175-181.
- Wijisman, C. A., M. P. Rozing, T. C. M. Streefland, S. le Cessie, S. P. Mooijaart, P. E. Slagboom, R. G. J. Westendorp, H. Pijl, D. van Heemst and L. L. S. group (2011). "Familial longevity is marked by enhanced insulin sensitivity." Aging cell **10**: 114-121.
- Wilcox, G. (2005). "Insulin and insulin resistance." The Clinical biochemist. Reviews **26**: 19-39.
- Wilcox, J. N., R. R. Subramanian, C. L. Sundell, W. R. Tracey, J. S. Pollock, D. G. Harrison and P. A. Marsden (1997). "Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **17**(11): 2479-2488.
- Wu, J., S. Xia, B. Kalionis, W. Wan and T. Sun (2014). "The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging." BioMed research international **2014**: 615312.
- Xia, Y. and M. Karmazyn (2004). "Obligatory role for endogenous endothelin in mediating the hypertrophic effects of phenylephrine and angiotensin II in neonatal rat ventricular myocytes: evidence for two distinct mechanisms for endothelin regulation." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **310**: 43-51.
- Xiao, C., A. Giacca and G. F. Lewis (2009). "The effect of high-dose sodium salicylate on chronically elevated plasma nonesterified fatty acid-induced insulin resistance and β -cell dysfunction in overweight and obese nondiabetic men." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **297**(5): E1205-E1211.
- Xu, J.-W., I. Morita, K. Ikeda, T. Miki and Y. Yamori (2007). "C-reactive protein suppresses insulin signaling in endothelial cells: role of spleen tyrosine kinase." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **21**: 564-573.
- Yamamoto, K., T. Masuyama, Y. Sakata, R. Doi, K. Ono, T. Mano, H. Kondo, T. Kuzuya, T. Miwa and M. Hori (2000). "Local neurohumoral regulation in the transition to isolated diastolic heart failure in hypertensive heart disease: absence of AT1 receptor downregulation and 'overdrive' of the endothelin system." Cardiovascular research **46**(3): 421-432.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**: 411-415.
- Yang, Y. J., I. D. Hope, M. Ader and R. N. Bergman (1989). "Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs." The Journal of clinical investigation **84**: 1620-1628.
- Yono, M., J. Latifpour, W. Takahashi, M. Pouresmail, P. Afiatpour and R. M. Weiss (2004). "Age-related changes in the properties of the endothelin receptor system at protein and mRNA levels in the rat vas deferens." Journal of receptor and signal transduction research **24**: 53-66.
- Yosten, G. L. C. and G. R. Kolar (2015). "The physiology of proinsulin C-peptide: unanswered questions and a proposed model." Physiology **30**(4): 327-332.
- Yu, C., Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen and G. I. Shulman (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor

- substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." The Journal of biological chemistry **277**: 50230-50236.
- Zaia, A. and L. Piantanelli (2000). "Insulin receptors in the brain cortex of aging mice." Mechanisms of ageing and development **113**: 227-232.
- Zanetti, M., G. Gortan Cappellari, I. Burekovic, R. Barazzoni, M. Stebel and G. Guarnieri (2010). "Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular aging: Effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta." Experimental gerontology **45**: 848-855.
- Zanquetta, M. M., P. M. Seraphim, D. H. Sumida, J. Cipolla-Neto and U. F. Machado (2003). "Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane." Journal of pineal research **35**: 141-148.
- Zeng, G., F. H. Nystrom, L. V. Ravichandran, L.-N. Cong, M. Kirby, H. Mostowski and M. J. Quon (2000). "Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells." Circulation **101**(13): 1539-1545.
- Zeng, G., F. H. Nystrom, L. V. Ravichandran, L. N. Cong, M. Kirby, H. Mostowski and M. J. Quon (2000). "Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells." Circulation **101**: 1539-1545.
- Zhang, Q.-J., Q.-X. Li, H.-F. Zhang, K.-R. Zhang, W.-Y. Guo, H.-C. Wang, Z. Zhou, H.-P. Cheng, J. Ren and F. Gao (2007). "Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation." Cardiovascular research **75**: 369-380.
- Zhu, X., L. Orci, R. Carroll, C. Norrbom, M. Ravazzola and D. F. Steiner (2002). "Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 10299-10304.
- Zorzano, A., W. Wilkinson, N. Kotliar, G. Thoidis, B. E. Wadzinski, A. E. Ruoho and P. F. Pilch (1989). "Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations." The Journal of biological chemistry **264**: 12358-12363.

ANEXOS

Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral



Effects of age and caloric restriction on the cardiac and coronary response to endothelin-1 in rats



Miriam Granado^{a,b,*}, Carmen Rubio^c, Sara Amor^a, Luis Monge^a, Nuria Fernández^a, Gonzalo Carreño-Tarragona^a, José M. Carrascosa^c, Ángel Luis García-Villalón^a

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, 28029 Madrid, Spain

^b CIBER Fisiopatología de Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2014

Received in revised form 29 October 2014

Accepted 31 October 2014

Available online 1 November 2014

Section Editor: Holly M Brown-Borg

Keywords:

Endothelin

Age

Caloric restriction

Langendorff

ABSTRACT

Background and aims: Aging is associated with alterations in the cardiovascular system such as increased vasoconstriction and decreased vasodilatation. Some of these changes are partially reversed by caloric restriction. Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor which levels increased with age. The aim of this study is to analyze the role of endothelin-1 in the cardiac and coronary changes induced by age and whether these changes may be attenuated by a three-month caloric restriction.

Methods and results: Hearts from young (3 months old), aged (24 months old) and aged rats after 3 months of caloric restriction were perfused according to the Langendorff technique. Coronary vasoconstriction to endothelin-1 was reduced in old rats, and endothelin-1 increased myocardial contractility (dP/dt) and heart rate in old but not in young rats. These changes observed in old rats were partly reversed by caloric restriction. Also, in the myocardial tissue of old rats the gene expression of endothelin-1, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) was increased, and the gene expression of endothelin ETB receptors and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was reduced, compared with young rats. Aging induced changes in the expression of ETB receptors and eNOS were reversed by caloric restriction.

Conclusions: These results suggest that aging produces alterations in myocardial and coronary responses to endothelin-1, that may be related to changes in expression of nitric oxide synthases and/or endothelin receptor subtypes, with some of these changes being prevented by caloric restriction.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

With advancing age there is a progressive impairment of the cardiovascular function, which underlies the high cardiovascular mortality among older patients. Prevalence of heart failure is markedly increased with age, and is associated with reduced cardiac output, diastolic function and altered regulation of blood pressure (Wei, 1992).

One of the factors which may be involved in the cardiac changes with aging is the vasoactive peptide endothelin-1. This peptide plays a role in the cardiovascular regulation in normal conditions and in pathological states, and both the peptide and its receptors are present in the heart and are increased during heart failure (Kobayashi et al., 1999). Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor which may regulate coronary blood flow, and also may have direct effect on the myocardial tissue (Russell and Molenaar, 2000). Both plasma level (Miyauchi et al., 1992; Nyberg et al., 2013) and local expression of endothelin-1 in the

heart (Iemitsu et al., 2002) are increased with age, which suggests that this peptide may play an enhanced role in aging.

Caloric restriction is the most effective intervention currently known to increase longevity and reduce the alterations caused by aging. Dietary restriction has beneficial effects on the cardiovascular system which seems to be mediated, at least in part, by an attenuation of the age-related increase in inflammation (Guo et al., 2002) and oxidative stress (Sohal and Weindruch, 1996). Caloric restriction also affects the levels of vasoactive molecules. Plasma concentrations of endothelin-1 are reduced by weight loss (Ferri et al., 1995; Maeda et al., 2006; Miyaki et al., 2009) but it is not known whether endothelin-1 expression and/or its effects in the heart are modified by caloric restriction in aged subjects.

The hypothesis of this study is that aging may produce changes in the role played by endothelin-1 in the heart, which may be related to the cardiac impairment associated with old age, and which may be reversed in part by caloric restriction. To test this hypothesis, the expression of endothelin-1 and its receptors, and the myocardial and coronary response to endothelin-1, were studied in hearts from aged rats under caloric restriction.

* Corresponding author at: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, C/Arzobispo Morcillo n°2, 28029 Madrid, Spain.

E-mail address: miriam.granado@uam.es (M. Granado).

2. Methods

2.1. Experimental animals

Three- and 24-month-old male Wistar rats from our in-house colony (Centre of Molecular Biology, Madrid, Spain) were used throughout this study. The use of 3-month-old rats as young controls allows excluding effects due to growth or maturation instead of aging as it has been previously described (Escriva et al., 1997). Rats were housed in climate-controlled quarters with a 12 h light cycle and fed ad libitum standard laboratory chow A04-10 Rodent Maintenance Diet (SAFE, Spain) and water. Handling of animals was performed according to European Union laws and the guidelines of the National Institutes of Health (NIH publication No. 86-23, revised 1985). Experimental procedures were approved by the Institutional Committee of Research Ethics. One week before starting the food restriction the animals were placed in individual cages and fed ad libitum in order to determine the normal daily food intake (average 20.1 g/day/rat).

2.2. Caloric restriction

A group of 21-month-old rats was assigned to undergo a caloric restriction protocol as described earlier (Perez et al., 2004). Animals were placed in individual cages and fed daily an amount of chow equivalent to 80% of normal food intake without supplementation with additional minerals or vitamins. Caloric restriction was prolonged during three months. At the end of the caloric restriction protocol animals show a body weight equivalent to 80–85% of ad libitum fed age-mates. If animals reached the expected final body weight before three months the chow amount provided was slightly changed to ensure that body weight does not decrease beyond a 20% of its initial value. This caloric restriction protocol has been developed in our laboratory for more than 20 years and is characterized for maintaining the proportions of food components without dietetic supplements. This protocol is considered as a bearable chronic dietetic intervention that renders aged animals with visceral adiposity index even lower than those of young ad libitum fed rats, being appropriate for studying the role of obesity in aging-associated physiological changes (Escriva et al., 1997; Horrillo et al., 2011). Caloric restricted animals were used at the age of 24 months, and killed by i.p. sodium pentobarbital (100 mg/kg) following i.v. injection of heparin (1000 UI). The number of animals in each experimental group were: 3 month-old ($n = 7$), 24 month-old fed at libitum ($n = 8$), 24 month-old with caloric restriction ($n = 8$).

2.3. Experimental set-up

The hearts were removed from the rats and immediately the ascending aorta was cannulated and the heart was subjected to retrograde perfusion with Krebs–Henseleit buffer (115 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 and 11 mM glucose) equilibrated with 95% oxygen and 5% carbon dioxide to a pH of 7.3–7.4. Perfusion was initiated in a non-recirculating Langendorff heart perfusion apparatus at a constant flow rate of 11–15 ml/min to provide a basal perfusion pressure of approximately 70 mm Hg. Both the perfusion solution and the heart were maintained at 37 °C. Coronary perfusion pressure was measured through a lateral connection in the perfusion cannula and left ventricular pressure was measured using a latex balloon inflated to a diastolic pressure of 5–10 mm Hg, both connected to Statham transducers (Viggo-Spectramed, Oxnard CA). Left ventricular developed pressure (systolic left ventricular pressure minus diastolic left ventricular pressure), left ventricular end-diastolic pressure, the first derivative of the left ventricular pressure curve (dP/dt) and heart rate were calculated from the left ventricular pressure curve. These parameters were recorded on a computer using the PowerLab/8e data acquisition system (AD instruments, Colorado Springs CO).

2.4. Experimental procedure

After a 20 min equilibration period with constant flow perfusion, endothelin-1 was injected into the perfusion cannula with an infusion pump over 3 min at a constant rate to reach a final concentration of 10^{-13} – 10^{-7} M, and the effect on coronary perfusion pressure, left intraventricular pressure and heart rate were recorded. As the experiments were performed at a constant flow rate, the coronary perfusion pressure provides a measure of the perfusion resistance and characterizes the contraction to endothelin-1.

2.5. RNA extraction and quantitative RT real time PCR

At the end of the experiment, the hearts were removed from the perfusion set-up and prepared for RNA extraction. Total RNA was extracted from the myocardium according to the Tri-Reagent protocol (Chomczynski, 1993). cDNA was then synthesized from 2 µg of total RNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Afterwards, endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor A (ET_A), endothelin receptor B (ET_B), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), transforming growth factor β (TGF-β), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1β (IL-1β) mRNA levels were assessed in heart samples by quantitative real-time PCR. Quantitative real-time PCR was performed by using assay-on-demand kits (Applied Biosystems) for each gene: ET-1 (Rn00561129_m1), ET_A (Rn00561137_m1), ET_B (Rn00569139_m1), eNOS (Rn02132634_s1), iNOS (Rn00561646_m1), nNOS (Rn00583793_m1), TGF-β (Rn00572010_m1), COX-2 (Rn01483828_m1), TNF-α (Rn01525859_g1), IL-6 (Rn01410330_m1), IL-1β (Rn00580432_m1), 18S (Rn01428915_m1). TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) was used for amplification according to the manufacturer's protocol in a Step One machine (Applied Biosystems). Values were normalized to the housekeeping gene 18S (Rn01428915). According to manufacturer's guidelines, the $\Delta\Delta\text{CT}$ method was used to determine relative expression levels. Statistics were performed using $\Delta\Delta\text{CT}$ values (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6. Statistical analysis

Values are expressed as the mean (\pm S.E.M.), and compared between the 3- and 24-month-old rats, or between the rats with caloric restriction and those fed at libitum, by unpaired Student's *t* test. A *P* value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Body composition

Body composition data are represented in Table 1. Aged rats fed ad libitum had increased body, visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue weights compared to young rats whereas heart and gastrocnemius weights were decreased. Caloric restriction attenuated age induced increases in body, visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue weights and age induced decreases in heart and gastrocnemius weights.

3.2. Functional parameters in the perfused hearts

In 24-month-old rats there was an increase in left ventricular developed pressure and in dP/dt, and a reduction in heart rate compared with 3-month-old animals. Caloric restriction did not modify any of the hemodynamic parameters (Table 1).

Table 1

Body, visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, gastrocnemius, heart weights, coronary perfusion pressure, left ventricular developed pressure and heart rate in young (3 months old) and aged (24 months old) rats fed ad libitum or under 3 months of caloric restriction; and basal functional parameters in hearts from these rats. Data are represented as mean \pm SEM (n = 8). *P < 0.05 vs 3 months; ***P < 0.001 vs 3 months; #P < 0.05 vs 24 months; ##P < 0.01 vs 24 months; ###P < 0.001 vs 24 months.

	3 months (A)	24 months (B)	24 months + caloric restriction (C)	% difference between C and B
Body weight (g)	381	621 ^{***}	505 ^{###}	–18.7%
Visceral adipose tissue (g/100 g bw)	2.5	3.7 ^{***}	2.6 ^{###}	–29.7%
Subcutaneous adipose tissue (g/100 g bw)	1.3	3.2 ^{***}	2.4 ^{##}	–25%
Gastrocnemius (g/100 g bw)	0.52	0.34 ^{***}	0.40 [#]	17.6%
Heart (g/100 g bw)	0.38	0.28 ^{***}	0.35 ^{##}	25%
Coronary perfusion, pressure (mm Hg)	76 \pm 3	77 \pm 6	78 \pm 4	1.3%
Left ventricular developed pressure (mm Hg)	69 \pm 4	98 \pm 7 [*]	88 \pm 8	–10.2%
dp/dt (mm Hg/s)	2093 \pm 203	2737 \pm 151 [*]	2814 \pm 151	2.8%
Heart rate (beats/min)	244 \pm 7	169 \pm 21 [*]	222 \pm 19 [#]	31.4%

3.3. Metabolic profile

Glucose, insulin, triglyceride, non-esterified fatty acids (NEFA) and cholesterol serum levels are shown in Table 2. Glucose and insulin serum levels were unchanged between groups. Triglyceride, NEFA and cholesterol serum levels were increased in aged rats compared to young rats (P < 0.001, P < 0.01 and P < 0.001, respectively). Caloric restriction for three months significantly decreased triglyceride and NEFA (P < 0.05 for both) but not cholesterol serum levels.

3.4. Coronary vasoconstriction to endothelin-1

Injection of endothelin-1 into the coronary circulation induced concentration-dependent increases of the coronary perfusion pressure in the perfused hearts from all experimental groups. The sensitivity of this response was reduced in 24-month-old rats compared with 3-month-old rats (pD₂ = 8.9 \pm 0.3 and 10.3 \pm 0.3 in 24- and 3-month-old animals, respectively; P < 0.05), without modifying the maximal response (Fig. 1A). Caloric restriction increased the sensitivity to endothelin-1 (pD₂ = 9.9 \pm 0.2, P < 0.05 vs fed ad libitum) in 24-month-old rats.

3.5. Effect of endothelin-1 on ventricular contractility

The highest concentrations of endothelin-1 used (10^{–8}–10^{–7} M) reduced dp/dt and left ventricular developed pressure in all experimental groups. Lower concentrations (10^{–11}–10^{–9}) increased dp/dt in 24-month-old rats but not in young animals. This effect was abolished by caloric restriction, so endothelin-1 did not increase dp/dt in 24-month-old rats under caloric restriction. These low concentrations of endothelin-1 also tended to increase left ventricular developed pressure, but in this case the effect was not significant in any experimental group (Fig. 1B).

Table 2

Glucose (mg/dl), insulin (ng/ml), triglyceride (mmol/l), non-esterified fatty acid (NEFA, mmol/l) and cholesterol (mmol/l) serum levels in young (3 months old) and aged (24 months old) rats fed ad libitum or under 3 months of caloric restriction; data are represented as mean \pm SEM (n = 8). **P < 0.01 vs 3 months; ***P < 0.001 vs 3 months; #P < 0.05 vs 24 months.

	3 months	24 months	24 months + caloric restriction
Glucose (mg/dl)	132 \pm 2	142 \pm 2	144 \pm 3
Insulin (ng/ml)	0.8 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
Triglyceride (mmol/l)	0.37 \pm 0.03	0.85 \pm 0.10 ^{***}	0.50 \pm 0.10 [#]
NEFA (mmol/l)	0.79 \pm 0.01	0.65 \pm 0.01 ^{**}	0.55 \pm 0.02 [#]
Cholesterol (mmol/l)	1.39 \pm 0.32	3.76 \pm 0.12 ^{**}	3.48 \pm 0.35

3.6. Effect of endothelin-1 on heart rate

Endothelin-1 did not modify the heart rate, except at the highest concentration used (10^{–7} M) which increased heart rate in 24-month-old rats fed at libitum, but not in rats of this age under caloric restriction, nor in 3-month-old animals (Fig. 1C).

3.7. ET-1, ET_A and ET_B gene expression in the heart

Aging increased the gene expression of ET-1 (P < 0.05; Fig. 2A) and decreased the gene expression of ET_B in the heart (P < 0.01; Fig. 2C). Caloric restriction did not decrease aging-induced overexpression of ET-1 but it prevented aging-induced downregulation of ET_B. ET_A mRNA levels were unchanged in response to both aging and caloric restriction (Fig. 2B).

3.8. eNOS, iNOS and nNOS gene expression in the heart

eNOS gene expression was decreased (Fig. 3B) in the heart of 24-month-old rats fed ad libitum whereas iNOS gene expression was increased (Fig. 3C). Caloric restriction did not decrease aging-induced overexpression of iNOS but it prevented aging-induced downregulation of eNOS. nNOS mRNA levels were unchanged in response to both aging and caloric restriction (Fig. 3A).

3.9. COX-2, TNF- α , TGF- β , IL-6 and IL-1 β gene expression in the heart

Neither aging nor caloric restriction modifies the mRNA levels of COX-2, TGF- β , IL-6 and IL-1 β in the heart (Fig. 4A, C, D and E, respectively). However TNF- α gene expression was increased in both, 24-month-old rats fed at libitum and 24-month-old animals under caloric restriction compared to 3-month-old rats (Fig. 4B).

4. Discussion

Our results here suggest that endothelin-1 may have a role in the aging-associated changes known to occur in the cardiac and coronary function. Firstly, endothelin-1 expression in the myocardial tissue was elevated in old rats of 24 months of age, compared with young rats. Endothelin-1 may be produced locally in the heart in myocardial and/or coronary endothelial cells (Yamamoto et al., *Cardiovasc Res* 46: 421–432, 2000; Iwanaga et al., *Circulation* 98: 2065–2073, 1998; Oie et al., *Am J Physiol* 273: H1727–H1736, 1997; Chen et al., *J Mol Cell Cardiol* 32: 1621–1629, 2000) and act as a paracrine substance. Therefore, the increased expression of this peptide observed in aged animals suggests that it may have an enhanced function and/or effects in this condition.

Endothelin-1 may act through two different receptor subtypes, ET_A and ET_B, which usually have opposite actions. In our study, aging elicits differential effects on the expression of these receptor subtypes. While

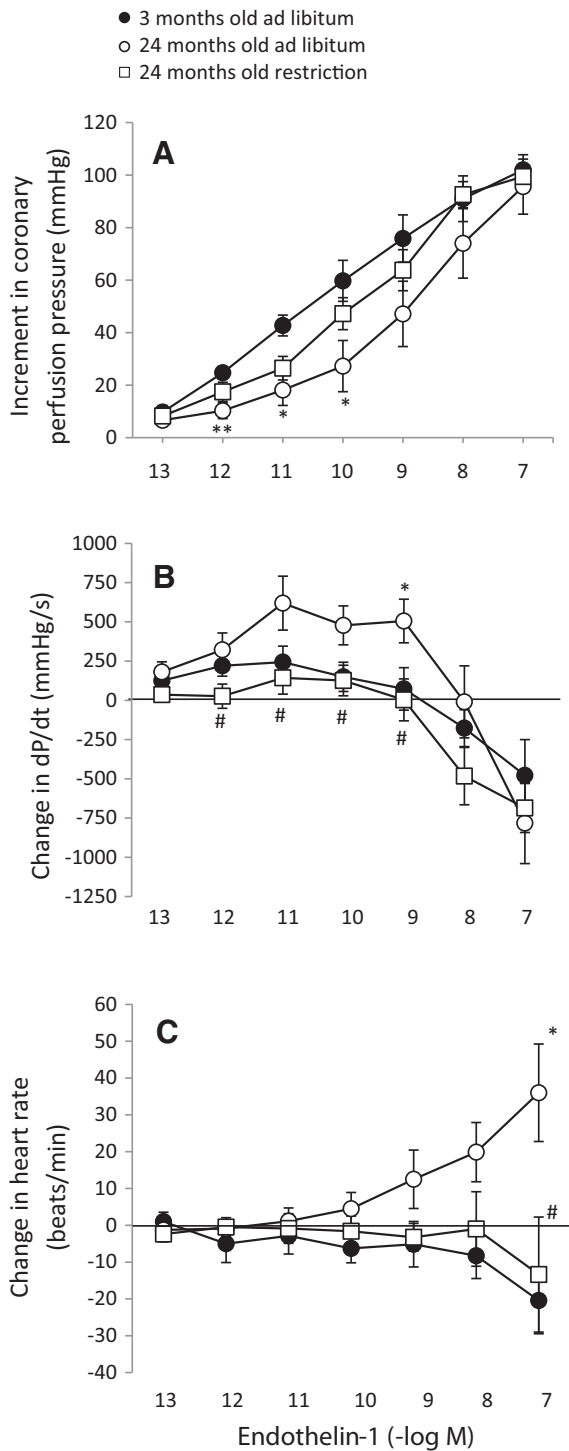


Fig. 1. Coronary vasoconstriction (A), changes in dP/dt (B) and changes in heart rate (C) in response to endothelin-1 (10^{-13} – 10^{-7} M) in perfused hearts from 3- ($n = 7$) and 24- ($n = 8$) month-old rats fed ad libitum, or 24-month-old animals after 3 months of caloric restriction ($n = 8$). * $P < 0.05$ between 3- and 24- month-old rats fed ad libitum. ** $P < 0.01$ between 3- and 24- month-old rats fed ad libitum. # $P < 0.05$ between 24-month-old rats fed ad libitum or under caloric restriction. Values are represented as mean \pm S.E.M.

the expression of ET_A receptor was not modified, the expression of ET_B receptor was reduced with age. Moreover, this reduction was reverted by caloric restriction. These changes in the expression of endothelin receptors may have influence in the response to this peptide. Endothelin-1 has a biphasic effect on myocardial contractility, assessed by dP/dt. At high, supraphysiological concentrations, endothelin-1 reduced dP/dt in every experimental group. This effect is probably due to the impairment

in the myocardial perfusion associated with the strong coronary vasoconstriction produced by endothelin-1 at these concentrations (Clozel and Clozel, 1989). On the contrary, lower concentrations of endothelin-1 increased myocardial contractility, and this effect was absent in young rats. There is evidence that endothelin-1 has a positive inotropic effect on the heart (Ishikawa et al., 1988b), which may be due to activation of endothelin receptors of ET_A subtype (Pieske et al., 1999). This inotropic effect may have a physiological role in vivo, as infusion of an ET_A antagonist in normal subjects caused a reduction in contractility (Kaumann et al., 1999). The effect of the ET_B subtype on myocardial contractility has been less studied, but there is evidence that it may have opposite effects to those of ET_A (Leite-Moreira and Brás-Silva, 2004; Piuhola et al., 2003). Therefore, in the hearts from young rats, the effects of ET_A and ET_B might cancel each other, whereas in older rats the reduced expression of ET_B receptors would allow the positive inotropic effect of ET_A receptors to predominate. Likewise, the increase in ET_B receptors after caloric restriction may explain the abolition of the inotropic effect in this condition.

Endothelin-1 also might have positive chronotropic action in the perfused heart, although this effect is less evident, as it was only observed at the highest endothelin concentration used, and only in the group of 24-month old rats fed at libitum. This may be related to the lower basal heart rate in this group, which may facilitate the manifestation of the chronotropic effect of endothelin-1. It has been described previously that endothelin-1 may increase heart rate (Ishikawa et al., 1988a) but the receptor subtype involved is unclear.

The changes produced by aging in endothelin-1 effect on coronary arteries, however, were different from that on myocardial contraction, as the coronary vasoconstriction to endothelin-1 was reduced in the 24-month-old rats. This agrees with studies in the literature, although the reduction may be variable depending on vascular bed (Barton et al., 1997). In isolated coronary arteries from rats, this reduced coronary vasoconstriction was attributed to increased basal release of nitric oxide (Shipley and Muller-Delp, 2005). Although we have not studied directly the role of nitric oxide in our experimental conditions, an increase of nitric oxide might be involved, as we found an increased expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS). On the other hand, the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was reduced in aged rats. This may be associated with age-induced endothelial damage, as it has been described previously. But basal release of nitric oxide is more related to the expression of iNOS, which is continuously active (Aktan, 2004), so basal iNOS-produced nitric oxide could inhibit the coronary vasoconstriction to endothelin-1 in aged rats. This reduced vasoconstriction to endothelin-1 was also reverted in part by caloric restriction. However caloric restriction did not decrease iNOS gene expression in the heart which means that caloric restriction-induced increase of coronary vasoconstriction is not mediated by a decrease in iNOS-produced nitric oxide but by other mechanisms. eNOS is increased by caloric restriction, so this cannot explain the increased contraction to endothelin-1 in this condition. We suggest that in those conditions eNOS is less important for modifying endothelin-1 response.

As we have only measured ET_A and ET_B gene expression in the whole heart and not in coronary arteries we cannot discard that the expression of these receptors is altered in coronary arteries which could explain the altered coronary vasoconstriction to endothelin-1 in aged rats without caloric restriction.

It is reported that aging is associated with inflammation in different organs and tissues including the cardiovascular system (Michaud et al., 2013). In the present study although the gene expression of some inflammatory markers such as COX-2, IL-6, or IL-1 β was not modified in response to aging, we found an overexpression of iNOS and TNF- α in the heart of 24-month-old rats. Likewise the expression of these factors have been found to be increased both in the heart (Han et al., 2012) and in coronary arteries (Csiszar et al., 2002, 2003) of aged rats which indicates a mild state of inflammation in these tissues. Moderate caloric

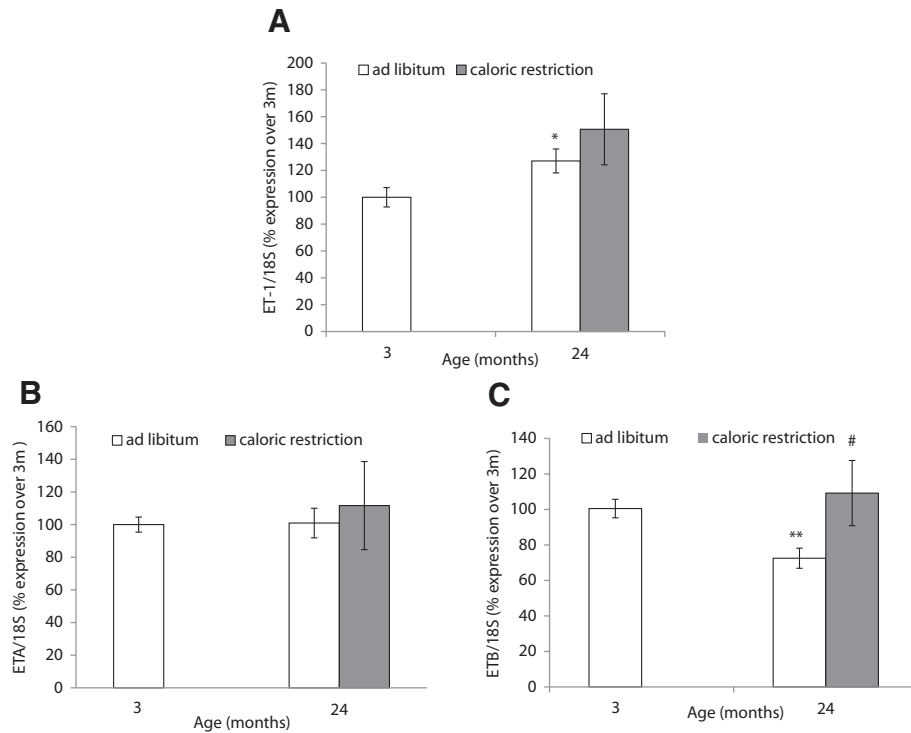


Fig. 2. Gene expression of endothelin-1 (A), endothelin receptor type ETA (B) and endothelin receptor type ETB (C), in hearts from rats aged 3 ($n = 7$) or 24 months ($n = 8$) fed at libitum, or 24 months after 3 months of caloric restriction ($n = 8$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ between 3- and 24-month-old rats fed at libitum. # $P < 0.05$ between 24-month-old rats fed at libitum or under caloric restriction during three months. Values are represented as mean \pm S.E.M.

restriction for three months did not prevent aging-induced increase of iNOS and TNF- α . The same protocol of caloric restriction did not prevent aging-induced changes in the expression of TNF- α in other tissues such

as the liver or the adipose tissue (Horillo et al., 2011), which could be explained by either the small reduction in caloric intake (20%) or by the short duration of caloric restriction (3 months). Indeed, a more

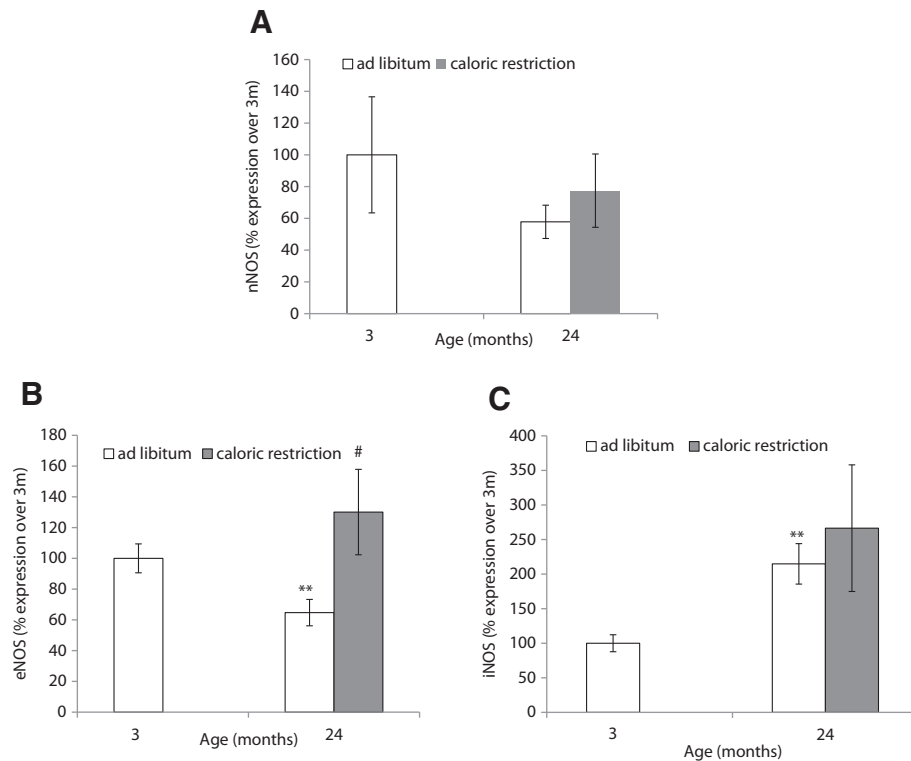


Fig. 3. Gene expression of nNOS (A), eNOS (B) and iNOS (C), in hearts from rats aged 3 ($n = 7$) or 24 months ($n = 8$) fed at libitum, or 24 months after 3 months of caloric restriction ($n = 8$), ** $P < 0.01$ between 3- and 24-month-old rats fed at libitum. # $P < 0.05$ between 24-month-old rats fed at libitum or under caloric restriction during three months. Values are represented as mean \pm S.E.M.

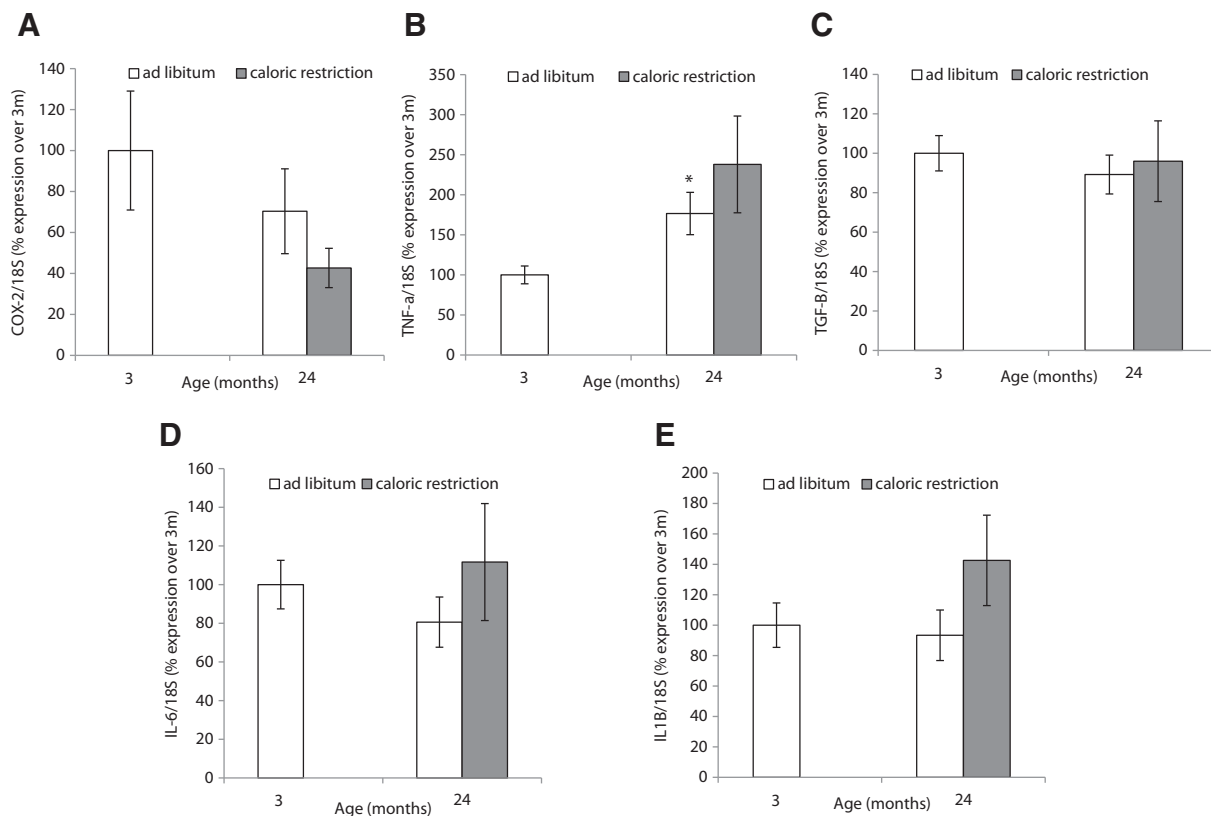


Fig. 4. Gene expression of COX-2 (A), TNF α (B), TGF β (C), IL-6 (D) and IL-1 β (E), in hearts from rats aged 3 (n = 7) or 24 months (n = 8) fed at libitum, or 24 months after 3 months of caloric restriction (n = 8). *P < 0.05 between 3- and 24-month-old rats fed at libitum. #P < 0.05 between 24-month-old rats fed at libitum or under caloric restriction during three months. Values are represented as mean \pm S.E.M.

prolonged protocol of caloric restriction (10% during 9 months) or a severer reduction in food intake (40% during 10 days) significantly decreased the expression of several genes involved in inflammation in the serum (Spaulding et al., 1997), the adipose tissue (Higami et al., 2006), and the kidney (Jung et al., 2009) of aged animals.

In conclusion, aging causes an increase in the tissular endothelin-1 in the myocardium, associated with positive inotropic and chronotropic effects and a reduced vasoconstriction. These effects would tend to enhance ventricular function and myocardial perfusion, and may have an adaptive role. Aged rats have increased body weight, which would require more cardiac output to supply blood flow to the tissues.

Indeed, obese subjects may have increased cardiac output to service increased body mass (Kardassis et al., 2012). As caloric restriction reverses the age induced increase in body weight, the changes in the myocardial and coronary effects of endothelin-1 are also reverted.

Conflict of interest

None declared.

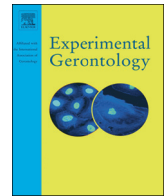
Acknowledgments

We are indebted to María Ester Martínez and Hortensia Fernández-Lomana for their invaluable technical assistance. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09/00394), the S2010/BMD-2423 from Comunidad de Madrid (CAM, Spain) and Projectos UAM-Banco de Santander con EEUU (Convocatoria 2013). The CBMSO is the recipient of institutional aid from the Ramón Areces Foundation.

References

- Aktan, F., 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75, 639–653.
- Barton, M., Cosentino, F., Brandes, R.P., Moreau, P., Shaw, S., Lüscher, T.F., 1997. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 30, 817–824.
- Chen, S., Evans, T., Mukherjee, K., Karmazyn, M., Chakrabarti, S., 2000. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32 (9), 1621–1629.
- Chen S., Evans T., Mukherjee K., Karmazyn M., Chakrabarti S., 2000. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32(9), 1621–9.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532–534 (536–537).
- Clozel, M., Clozel, J.P., 1989. Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 1125–1131.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G., 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ. Res.* 90, 1159–1166.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J.G., Kaley, G., 2003. Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB J.* 17, 1183–1185.
- Escriva, F., Agote, M., Rubio, E., Molero, J.C., Pascual-Leone, A.M., Andres, A., Satrustegui, J., Carrascosa, J.M., 1997. In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology* 138, 49–54.
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Francesco, L.D., Baldoncini, R., Santucci, A., Mattia, G.D., 1995. Plasma endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive men. *Diabetes* 44, 431–436.
- Guo, Z., Mitchell-Raymundo, F., Yang, H., Ikeno, Y., Nelson, J., Diaz, V., Richardson, A., Reddick, R., 2002. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1121–1131.
- Han, L., Li, M., Liu, Y., Han, C., Ye, P., 2012. Atorvastatin may delay cardiac aging by upregulating peroxisome proliferator-activated receptors in rats. *Pharmacology* 89, 74–82.
- Higami, Y., Barger, J.L., Page, G.P., Allison, D.B., Smith, S.R., Prolla, T.A., Weindrich, R., 2006. Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *J. Nutr.* 136, 343–352.

- Horillo, D., Sierra, J., Arribas, C., Frutos, M.G.-S., Carrascosa, J.M., Lauzurica, N., Fernández-Agulló, T., Ros, M., 2011. Age-associated development of inflammation in Wistar rats: effects of caloric restriction. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 140–150.
- Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Tanabe, T., Irukayama-Tomobe, Y., Goto, K., Matsuda, M., Yamaguchi, I., 2002. Effects of aging and subsequent exercise training on gene expression of endothelin-1 in rat heart. *Clin. Sci. (Lond.)* 103 (Suppl. 48), 152S–157S.
- Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T., 1988a. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflügers Arch.* 413, 108–110.
- Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T., 1988b. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.* 255, H970–H973.
- Iwanaga, Y., Kihara, Y., Hasegawa, K., Inagaki, K., Yoneda, T., Kaburagi, S., Araki, M., Sasayama, S., 1998. Cardiac endothelin-1 plays a critical role in the functional deterioration of left ventricles during the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in salt-sensitive hypertensive rats. *Circulation*. 98 (19), 2065–2073.
- Jung, K.J., Lee, E.K., Kim, J.Y., Zou, Y., Sung, B., Heo, H.S., Kim, M.K., Lee, J., Kim, N.D., Yu, B.P., Chung, H.Y., 2009. Effect of short term calorie restriction on pro-inflammatory NF- κ B and AP-1 in aged rat kidney. *Inflamm. Res.* 58, 143–150.
- Kardassis, D., Bech-Hanssen, O., Schönander, M., Sjöström, L., Petzold, M., Karason, K., 2012. Impact of body composition, fat distribution and sustained weight loss on cardiac function in obesity. *Int. J. Cardiol.* 159, 128–133.
- Kaumann, A., Bartel, S., Molenaar, P., Sanders, L., Burrell, K., Vetter, D., Hempel, P., Karczewski, P., Krause, E.G., 1999. Activation of beta2-adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. *Circulation* 99, 65–72.
- Kobayashi, T., Miyauchi, T., Sakai, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., Sugishita, Y., 1999. Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am. J. Physiol.* 276, H1197–H1206.
- Leite-Moreira, A.F., Brás-Silva, C., 2004. Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H1194–H1199.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−(Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Maeda, S., Jesmin, S., Iemitsu, M., Otsuki, T., Matsuo, T., Ohkawara, K., Nakata, Y., Tanaka, K., Goto, K., Miyauchi, T., 2006. Weight loss reduces plasma endothelin-1 concentration in obese men. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231, 1044–1047.
- Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M., Nourhashemi, F., 2013. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 14 (12), 877–882.
- Miyaki, A., Maeda, S., Yoshizawa, M., Misono, M., Saito, Y., Sasai, H., Endo, T., Nakata, Y., Tanaka, K., Ajisaka, R., 2009. Effect of weight reduction with dietary intervention on arterial distensibility and endothelial function in obese men. *Angiology* 60, 351–357.
- Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Iida, K., Ajisaka, R., Suzuki, N., Fujino, M., Goto, K., Masaki, T., Sugishita, Y., 1992. Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects. *Am. Heart J.* 123, 1092–1093.
- Nyberg, M., Mortensen, S.P., Hellsten, Y., 2013. Physical activity opposes the age-related increase in skeletal muscle and plasma endothelin-1 levels and normalizes plasma endothelin-1 levels in individuals with essential hypertension. *Acta Physiol. (Oxf.)* 207, 524–535.
- Oie, E., Vinge, L.E., Tønnessen, T., Grøgaard, H.K., Kjekshus, H., Christensen, G., Smiseth, O. A., Attramadal, H., 1997. Transient, isopeptide-specific induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure in rats. *Am. J. Physiol.* 273 (4 Pt 2), H1727–36.
- Perez, C., Fernandez-Galaz, C., Fernandez-Agullo, T., Arribas, C., Andres, A., Ros, M., Carrascosa, J.M., 2004. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53, 347–353.
- Pieske, B., Beyermann, B., Breu, V., Löffler, B.M., Schlotthauer, K., Maier, L.S., Schmidt-Schweda, S., Just, H., Hasenfuss, G., 1999. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 99, 1802–1809.
- Piuhola, J., Mäkinen, M., Szokodi, I., Ruskoaho, H., 2003. Dual role of endothelin-1 via ETA and ETB receptors in regulation of cardiac contractile function in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H112–H118.
- Russell, F.D., Molenaar, P., 2000. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 353–359.
- Shipley, R.D., Muller-Delp, J.M., 2005. Aging decreases vasoconstrictor responses of coronary resistance arterioles through endothelium-dependent mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 66, 374–383.
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63.
- Spaulding, C.C., Walford, R.L., Effros, R.B., 1997. Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF- α and IL-6 in C3B10RF1 mice. *Mech. Ageing Dev.* 93, 87–94.
- Wei, J.Y., 1992. Age and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 327, 1735–1739.
- Yamamoto, K., Masuyama, T., Sakata, Y., Doi, R., Ono, K., Mano, T., Kondo, H., Kuzuya, T., Miwa, T., Hori, M., 1997. Local neurohumoral regulation in the transition to isolated diastolic heart failure in hypertensive heart disease: absence of AT1 receptor down-regulation and 'overdrive' of the endothelin system. *Cardiovasc. Res.* 46 (3), 421–432.



Effects of age and caloric restriction in the vascular response of renal arteries to endothelin-1 in rats

Sara Amor^a, Angel Luis García-Villalón^a, Carmen Rubio^b, Jose Ma Carrascosa^b, Luis Monge^a, Nuria Fernández^a, Beatriz Martín-Carro^a, Miriam Granado^{a,c,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 2, 28029 Madrid, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

^c CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2016

Received in revised form 12 December 2016

Accepted 22 December 2016

Available online 27 December 2016

Keywords:

Aging

Cardiovascular

Endothelin-1

Caloric restriction

Renal arteries

ABSTRACT

Cardiovascular alterations are the most prevalent cause of impaired physiological function in aged individuals with kidney being one the most affected organs. Aging-induced alterations in renal circulation are associated with a decrease in endothelium-derived relaxing factors such as nitric oxide (NO) and with an increase in contracting factors such as endothelin-1 (ET-1). As caloric restriction (CR) exerts beneficial effects preventing some of the aging-induced alterations in cardiovascular system, the aim of this study was to analyze the effects of age and caloric restriction in the vascular response of renal arteries to ET-1 in aged rats. Vascular function was studied in renal arteries from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m) and in renal arteries from 8- and 24-month-old Wistar rats fed ad libitum (8 m and 24 m), or subjected to 20% caloric restriction during their three last months of life (8 m-CR and 24 m-CR). The contractile response to ET-1 was increased in renal arteries from 8 m and 24 m compared to 3 m rats. ET-1-induced contraction was mediated by ET-A receptors in all experimental groups and also by ET-B receptors in 24 m rats. Caloric restriction attenuated the increased contraction to ET-1 in renal arteries from 8 m but not from 24 m rats possibly through NO release proceeding from ET-B endothelial receptors. In 24 m rats, CR did not attenuate the aging-increased response of renal arteries to ET-1, but it prevented the aging-induced increase in iNOS mRNA levels and the aging-induced decrease in eNOS mRNA levels in arterial tissue. In conclusion, aging is associated with an increased response to ET-1 in renal arteries that is prevented by CR in 8 m but not in 24 m rats.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging is associated with a progressive deterioration of physiological function that impairs the ability of an organism to maintain homeostasis (Harman, 2001). Cardiovascular alterations are the most prevalent cause of impaired physiological function in aged individuals and increase their susceptibility to morbidity and mortality (Lakatta, 2015). As life expectancy has considerably increased worldwide in the last century, the incidence of age-induced cardiovascular diseases has also risen, being one of the main causes of mortality among a population above 65 years old (Lakatta and Levy, 2003).

Age induces changes in arterial structure and function (Harvey et al., 2015) that may underlie the age-related cardiovascular impairment, and among these changes, endothelial dysfunction may be central in the vascular pathophysiology during aging (Toda, 2012).

One of the factors involved in endothelial dysfunction during aging may be the vasoactive peptide endothelin-1 (ET-1). Plasma levels of ET-1 are increased with aging (Miyauchi et al., 1992; Nyberg et al., 2013), and the decline in endothelium-dependent vasodilatation is prevented by blockade of endothelin ET_A receptors (Westby et al., 2011).

Kidney is one of the organs strongly affected by aging (Wiggins et al., 2005; Yang and Fogo, 2010), and aging-induced decrease in renal function is related, at least in part, with alterations in renal circulation (Lindeman, 1990). As reviewed by other authors (Barton, 2014), in the kidney, physiological aging is associated with a decline in glomerular filtration rate and spontaneous development of focal-segmental glomerulosclerosis and tubulo-interstitial injury. Many of the cellular and structural abnormalities in the aging kidney resemble to those observed in patients with renal disease due to diabetes, obesity, or arterial hypertension. Therefore, it appears acceptable to compare pathological changes due to arterial hypertension or obesity with premature aging.

Among other factors, ET-1 is reported to play an important role in the development of renal disease (Kohan and Barton, 2014), as renal

* Corresponding author at: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo n°2, 28029 Madrid, Spain.
E-mail address: miriam.granado@uam.es (M. Granado).

arteries are particularly sensitive to ET-1 (Clozel and Clozel, 1989; Pernow et al., 1988; Widmer et al., 2006).

Aging is associated with an increase in ET-1 levels in different vascular beds (Barton et al., 1997; Goodwin et al., 1999; Granado et al., 2014; Korzick et al., 2005; MacIntyre et al., 2012) including renal vasculature (Goettsch et al., 2001). Increased ET-1 levels are reported to induce arterial stiffness and contribute to the development of cardiovascular complications such as atherosclerosis, myocardial infarction, stroke, and renal injury (Goettsch et al., 2001; Ziemann et al., 2005). Moreover, preclinical studies using endothelin receptor antagonists (ERA) have shown beneficial effects reducing aging-induced morphological alterations in the kidney such as glomerulosclerosis and podocytes ultrastructure (Barton, 2014; Ortmann et al., 2004). However, the effects of ERA treatment on renal function seem to be independent, at least in the short term, of blood pressure (Ortmann et al., 2004), suggesting direct structural beneficial effects rather than pressure-dependent effects.

In addition to structural alterations within the vasculature, the contractile response to ET-1 in renal arteries is also increased in aged rats (Meyer et al., 2014; Seo and Luscher, 1995) with this fact leading to reduced kidney perfusion and subsequent activation of the renin–angiotensin system, which contributes to the regulation of basal vasomotor tone and blood pressure (Barton et al., 1997; Kohan et al., 2011).

Based on this background, the aim of this study was to analyze the possible changes in the response of renal arteries to endothelin-1 during aging. In addition, since caloric restriction is one of the most effective interventions to counteract both aging-induced alterations in renal function (Wiggins et al., 2005) and aging-induced vascular impairment (Granado et al., 2014; Shinmura, 2011; Yan et al., 2013; Zanetti et al., 2010), the possible beneficial effects of caloric restriction in the response of renal arteries to ET-1 during aging are also studied. The knowledge of the alterations in vascular response during aging, and the mechanisms involved, may be useful to develop therapeutics to prevent or reverse these alterations.

2. Material and methods

2.1. Animals

Three- (3 m; $n = 13$), eight- (8 m; $n = 16$), and 24-month-old (24 m; $n = 24$) male Wistar rats from our in-house colony (Centre of Molecular Biology, Madrid, Spain) were used throughout this study. Rats were housed in climate-controlled quarters with a 12 h light cycle and fed ad libitum standard laboratory chow A04-10 Rodent Maintenance Diet (SAFE, Spain) and water. Handling of animals was performed according to European Union laws. Experimental procedures were approved by the Institutional Committee of Research Ethics.

2.2. Caloric restriction

Three months before sacrifice, half of the rats from the 8 m ($n = 8$) and 24 m ($n = 12$) experimental groups were assigned to undergo a moderate caloric restriction protocol, as previously described (De Solis et al., 2012; Granado et al., 2014; Horrillo et al., 2011). Briefly, animals were placed in individual cages and fed a daily amount of chow equivalent to 80% of normal food intake. Caloric restriction was prolonged over 3 months. At the end of the caloric restriction, protocol animals showed a body weight equivalent to 80–85% of ad libitum fed aged mates. It has been proven that this caloric restriction decreases the adiposity index, especially visceral fat, even below the adiposity index of young animals fed ad libitum without compromising the nutritional status of the animals. Thus, it could be considered as a reasonable and bearable dietetic intervention, similar to that usually prescribed in humans to lose weight.

2.3. Collection of renal arteries

Restricted (CR) and ad libitum fed rats were decapitated at the ages of 3, 8, and 24 months old previously anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg i.p.). Immediately after death, renal arteries were carefully dissected and either stored in cold isotonic saline solution for the in vitro vascular response studies or frozen on dry ice for the RT-PCR analysis.

2.4. Recording of vascular response

After sacrifice, arteries from 3-month-old rats (3 m), 8-month-old rats (8 m), 8-month-old rats subjected to CR (8 m-CR), 24-month-old rats (24 m), and 24-month-old rats subjected to caloric restriction (24 m-CR) were collected and cut in 2 mm segments. Each segment was prepared for isometric tension recording in a 4-ml organ bath containing modified Krebs–Henseleit solution at 37 °C (mM): NaCl, 115; KCl, 4.6; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 2.5; NaHCO₃, 25; glucose, 11. The solution was equilibrated with 95% oxygen and 5% carbon dioxide to a pH of 7.3–7.4. Briefly, two fine steel wires (100 µm in diameter) were passed through the lumen of the vascular segment. One wire was fixed to the organ bath wall and the other wire was connected to a strain gauge for isometric tension recording (Universal Transducing Cell UC3 and Statham Microscale Accessory UL5, Statham Instruments, Inc.). This arrangement permits passive tension to be applied in a plane perpendicular to the long axis of the vascular cylinder. The changes in isometric force were recorded using a PowerLab data acquisition system (ADInstruments). After applying an optimal passive tension of 0.75 g, vascular segments were allowed to equilibrate for 60–90 min. Afterwards, segments were stimulated with potassium chloride (KCl 100 mM) to determine the contractility of smooth muscle. Segments which failed to contract at least 0.5 g to KCl were discarded.

After equilibration, cumulative dose–response curves in response to ET-1 ($10^{-10.5}$ – $10^{-6.5}$ M) were recorded in each segment. Contraction in response to ET-1 was expressed as the percentage of the maximal contraction produced by KCl 100 mM. Vascular segments response to ET-1 was also recorded after pre-incubation for 20 min with the antagonist of endothelin ET_A receptors BQ123 (10^{-7} M), the antagonist of endothelin ET_B receptors BQ788 (10^{-7} M), or the inhibitor of nitric oxide synthase L-NAME (10^{-4} M). For each dose–response curve, the logarithm of the concentration producing 50% of the maximal response ED₅₀ was calculated by geometric interpolation.

2.5. Nitrite determination in the culture medium

Nitrite concentrations were measured in the culture medium by a modified method of Griess assay, described by Miranda et al. (2001). Briefly, 100 µl of vanadium chloride were added to 100 µl of culture medium in 96-well plate. Immediately after Griess reagent (1:1 mixture of 1% sulfanilamide, and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride) was added to each well and incubated at 37 °C for 30 min. The absorbance was measured at 540 nm. Nitrite concentration was calculated using a NaNO₂ standard curve and expressed as µM.

2.6. RNA preparation and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from the hypothalamus according to the Tri-Reagent protocol (Chomczynski, 1993). cDNA was then synthesized from 1 µg of total RNA by using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Endothelin-1 (ET-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and transforming growth factor beta (TGF-β) were assessed in renal artery samples by quantitative real-time PCR. Briefly, quantitative real-time PCR was performed by using assay-on-

demand kits (Applied Biosystems) for each gene: ET-1 (Rn00561129_m1), eNOS (Rn02132634_s1), iNOS (Rn00561646_m1), nNOS (Rn00583793_m1), COX-2 (Rn01483828_m1), IL-6 (Rn01489669_m1), IL-1 β (Rn00580432_m1), TNF- α (Rn01525859_g1), and TGF- β (Rn00572010_m1). Taq-Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) was used for amplification according to the manufacturer's protocol in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Values were normalized to the housekeeping gene 18S. According to manufacturer's guidelines, the $\Delta\Delta CT$ method was used to determine relative expression levels. Statistics were performed using $\Delta\Delta CT$ values (Livak and Schmittgen, 2001). All data are expressed as % control (3 m).

2.7. Immunoblotting

Arterial tissue was homogenized using RIPA buffer, and total protein content was analyzed by the Bradford method. In each assay, the same amount of protein was loaded in all wells (100 μ g), and resolving gels with SDS acrylamide gels (10%) were used. After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad) and transfer efficiency was determined by Ponceau red dyeing. Membranes were then blocked with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% (w/v) non-fat dried milk and incubated with the appropriate primary antibody: Endothelin-1 receptor A (ET-A) or Endothelin-1 receptor B (ET-B) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Membranes were subsequently washed and incubated with the corresponding secondary antibody conjugated with peroxidase (1:2000; Pierce, Rockford, IL, USA). Peroxidase activity was visualized by chemiluminescence and quantified by densitometry using BioRad Molecular Imager ChemiDoc XRS System. All blots were rehybridized with β -tubuline (Sigma-Aldrich) to normalize each sample for gel-loading variability. All data are normalized to control values on each gel.

2.8. Drugs

The following substances were used: BQ123 (cycloAsp-Pro-Val-Leu-Trp), BQ788 (2,6-Dimethylpiperidinecarbonyl- γ -Methyl-Leu-N_{in}-(Methoxycarbonyl)-D-Trp-D-Nle, N-[N-[N-[(2,6-Dimethyl-1-piperidinyl)carbonyl]-4-methyl-L-leucyl]-1-(methoxycarbonyl)-D-tryptophyl]-D-norleucine sodium salt), and L-NAME (*N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), all from Sigma. Endothelin-1 (human, porcine...) was purchased from Bachem (Switzerland).

2.9. Statistical analysis

Values are expressed as the mean (\pm SEM). To assess the effects of age, one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test has been performed. In addition, to determine the effects of caloric restriction, unpaired Student's *t* test was performed comparing 24 m-CR vs 24 m rats and 8 m-CR vs 8 m rats. The effects of the treatments (L-NAME, BQ-123, and BQ-788) within each experimental group were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for each concentration of ET-1. A *p* value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Results in 8-month-old rats

3.1.1. Effect of age and caloric restriction in the contractile response of renal arteries to endothelin-1

Fig. 1 shows the contractile response to ET-1 expressed by % contraction to KCl (A), and the log of ED50 calculated from the ET-1 dose-response curves of renal artery segments from 3 m, 8 m and 8 m-CR rats. ET-1 induced a concentration-dependent contraction of renal artery segments in all experimental groups. The contractile response to ET-1 was significantly increased in renal artery segments from 8 m

rats compared to 3 m at the doses of $10^{-7.5}$ M ($P < 0.05$), 10^{-7} M ($P < 0.001$), and $10^{-6.5}$ M ($P < 0.001$), and this effect was blunted by caloric restriction at the doses of 10^{-7} M and $10^{-6.5}$ M ($P < 0.05$ for both). This was associated with a significant increase in the area under curve (AUC) in 8 m compared to 3 m ($P < 0.01$) and to 8 m-CR ($P < 0.05$). However, we did not find significant changes in the log of ED50 among experimental groups.

3.1.2. Implication of endothelin receptors ET-A and ET-B in the contractile response of renal artery segments to ET-1

Pre-incubation of renal artery segments with the antagonist of endothelin ET_A receptors BQ123 shifted to the right the concentration-response curve to ET-1 in 3 m rats (Fig. 2A; $P < 0.01$), 8 m rats (Fig. 2B; $P < 0.05$), and 8 m-CR rats (Fig. 2C; $P < 0.001$). This effect was associated with a significant increase in the log of ED50 in all experimental groups (Fig. 2D; $P < 0.01$ vs 3 m-control; $P < 0.05$ vs 8 m-control; $P < 0.001$ vs 8 m-CR-control) and with a decrease in the AUC in 8 m and 8 m-CR rats ($P < 0.05$ for both). In addition, ET-A blockade significantly increased the contractile response of renal artery segments to ET-1 in 3 m rats at the dose of $10^{-6.5}$ M (Fig. 2A; $P < 0.05$ vs control) but not in renal artery segments from 8 m and 8 m-CR rats.

Pre-incubation of renal artery segments with the antagonist of endothelin ET_B receptors BQ788 did not modify the contractile response to ET-1 and the log of ED50 neither in 3 m rats nor in 8 m rats. However, it significantly increased the contractile response to ET-1 in renal artery segments from 8 m-CR rats at the doses of 10^{-8} M ($P < 0.01$ vs control) and $10^{-7.5}$ M ($P < 0.01$ vs control) and the AUC compared to both 3 m and 8 m rats ($P < 0.05$ for both).

3.1.3. Effect of age and caloric restriction in the gene expression of endothelin-1 and in the content of endothelin-1 receptors in renal arteries

ET-1 gene expression in renal arteries was unchanged in 8 m rats (138 ± 34) compared to 3 m rats (100 ± 9.8) but it was significantly decreased in renal arteries from 8 m-CR (73 ± 9) in comparison to 8 m rats ($P < 0.05$). The protein levels of receptor ET-A were significantly up-regulated in renal arteries from 8 m and 8 m-CR compared to 3 m rats (Fig. 2E; $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). On the contrary, ET-B protein levels were only significantly increased in renal arteries from 8 m-CR compared to 3 m rats (Fig. 2F; $P < 0.01$).

3.1.4. Implication of nitric oxide in the contractile response of renal artery segments to ET-1

To investigate the role of nitric oxide in the contractile response of renal arteries to ET-1, some segments from 3 m, 8 m, and 8 m-CR rats were pre-incubated with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (10^{-4} M) before the endothelin dose-response curve (Fig. 3). L-NAME pre-incubation did not modify the contractile response to ET-1 in renal artery segments from 8 m rats. On the contrary, L-NAME shifted to the left the dose-response curve of ET-1 in renal artery segments from 3 m rats (Fig. 3A) and significantly increased the contractile response to ET-1 at the doses $10^{-8.5}$ M ($P < 0.01$), 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-7} M, and $10^{-6.5}$ M ($P < 0.05$). This effect was associated with a significant decrease in the log of ED50 of L-NAME segments compared to controls (Fig. 3D; $P < 0.05$). Likewise, the contractile response to ET-1 was significantly higher in renal artery segments from 8 m-CR rats incubated with L-NAME compared to controls (Fig. 3C) at the doses of 10^{-8} M ($P < 0.01$), $10^{-7.5}$ M ($P < 0.001$), 10^{-7} M ($P < 0.001$), and $10^{-6.5}$ M ($P < 0.001$), and this was also associated with a significant decrease in the log of ED50 (Fig. 3D; $P < 0.01$).

In addition, the concentration of nitrites was measured in the culture medium after incubation of renal artery segments from 3 m rats, 8 m rats and 8 m-CR rats either with vehicle (control) or Endothelin-1 (ET-1) 10^{-7} M for 30 min (Table 1). The concentration of nitrites, both in basal conditions and after ET-1 incubation, was significantly increased in 8 m and 8 m-CR rats compared to 3 m rats ($P < 0.001$). Incubation with ET-1 did not modify the concentration of nitrites in any of

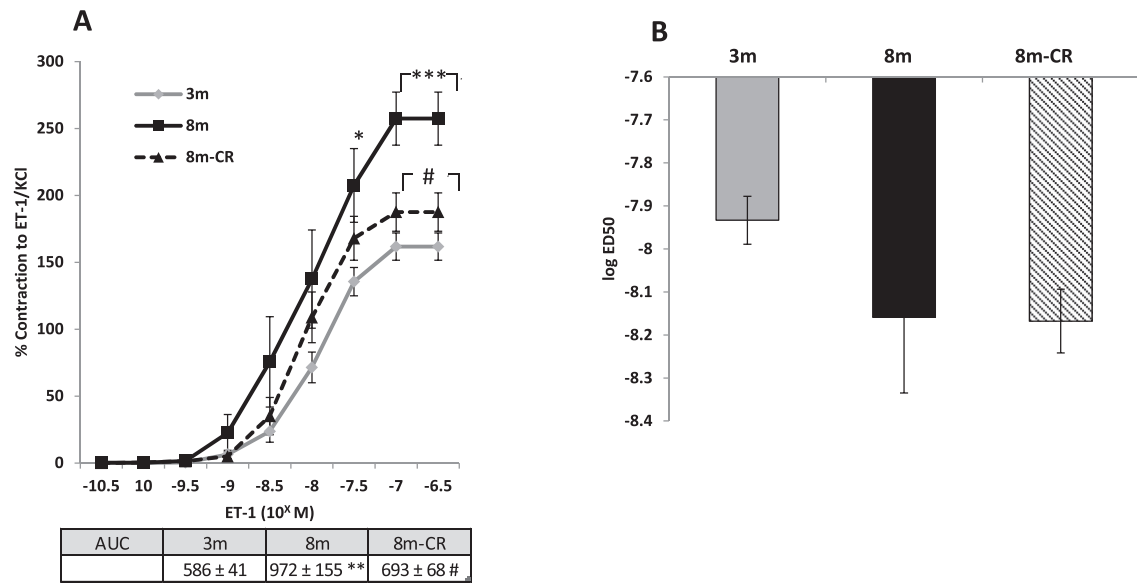


Fig. 1. Contractile response (1A) and log of ED50 (1B) of renal artery segments from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m) and 8-month-old Wistar rats fed ad libitum (8 m), or subjected to caloric restriction (8 m-CR) in response to endothelin-1. Data are represented as mean ± SEM ($n = 8$ rats/group). * $P < 0.05$ vs 3 m; ** $P < 0.01$ vs 3 m; *** $P < 0.001$ vs 3 m; # $P < 0.05$ vs 8 m.

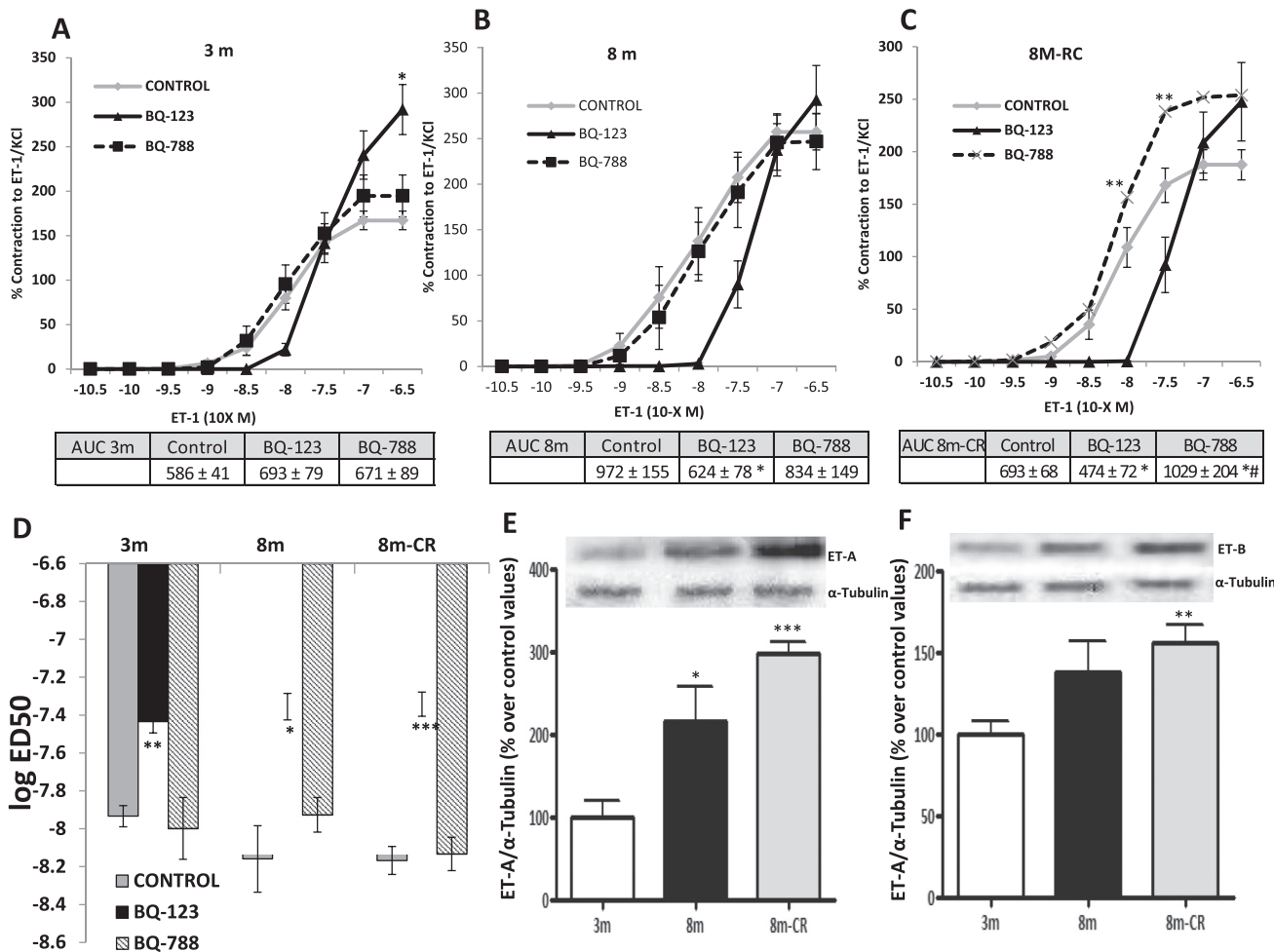


Fig. 2. Contractile response of renal artery segments from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m; 2A) and 8-month-old Wistar rats fed ad libitum (8 m; 2B), or subjected to caloric restriction (8 m-CR; 2C) and log of ED50 (2D) in response to endothelin-1 after pre-incubation with vehicle, BQ-123 or BQ-788. Fig. 2E and F represent the protein levels of endothelin-1 receptor A and endothelin-1 receptor B respectively in renal arteries from 3 m, 8 m, and 8 m-CR rats. Data are represented as mean ± SEM ($n = 8$ rats/group). * $P < 0.05$ vs 3 m; ** $P < 0.01$ vs 3 m; *** $P < 0.001$ vs 3 m; # $P < 0.05$ vs 8 m.

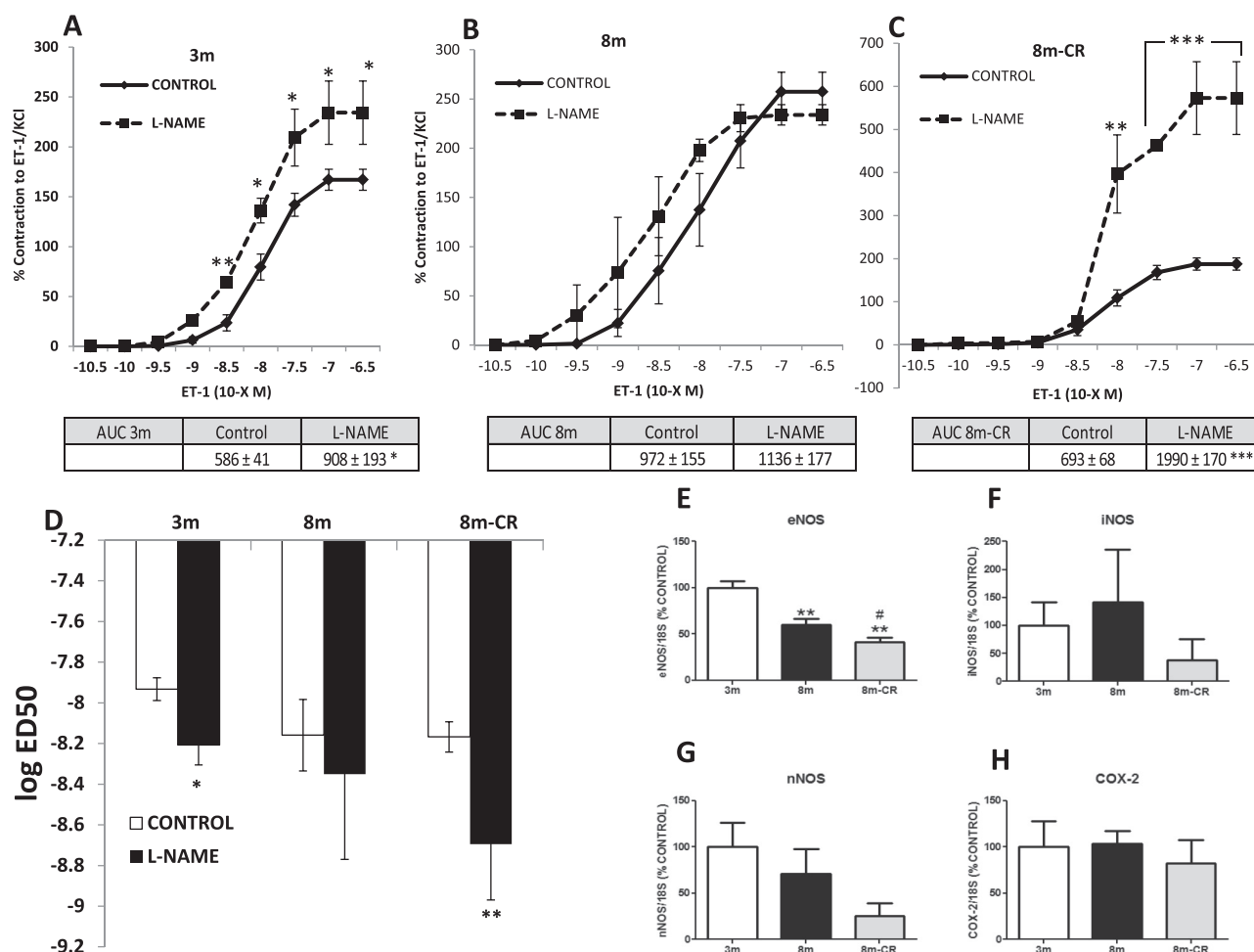


Fig. 3. Contractile response of renal artery segments from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m; 3A) and 8-month-old Wistar rats fed ad libitum (8 m; 3B), or subjected to caloric restriction (8 m-CR; 3C) and log of ED50 (3D) in response to endothelin-1 after pre-incubation with vehicle or N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). Fig. 3E, F, G, and H represent the gene expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2), respectively, in renal arteries from 3 m, 8 m, and 8 m-CR rats. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 8 rats/group). **P* < 0.05 vs 3 m; ***P* < 0.01 vs 3 m; ****P* < 0.001 vs 3 m; #*P* < 0.05 vs 8 m.

the experimental groups, although this concentrations was significantly increased in the culture medium of 8 m-CR rats compared to 8 m rats after ET-1 incubation (*P* < 0.05).

3.1.5. Effect of age and caloric restriction in the gene expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in renal arteries

In renal arteries, eNOS mRNA levels were significantly decreased in 8 m and 8 m-CR rats compared to 3 m rats (Fig. 3E; *P* < 0.01 for both).

Table 1

Concentration of nitrites (μM) in culture medium after incubation of renal artery segments from 3-month-old rats (3 m), 8-month-old rats (8 m), and 8-month-old rats subjected to caloric restriction (8 m-CR) either with vehicle (control) or endothelin-1 (ET-1) 10⁻⁷ M for 30 min.

	Control	ET-1 (10 ⁻⁷ M)
3 m	1.5 ± 0.3 ^{c,d,e,f}	2.4 ± 0.3 ^{c,d,e,f}
8 m	9.7 ± 1.5 ^{a,b}	6.8 ± 0.7 ^{a,b,e,f}
8 m-CR	10.5 ± 0.7 ^{a,b,d}	9.1 ± 1 ^{a,b,d}

^a Statistically different from 3 m-control.

^b Statistically different from 3 m-ET1.

^c Statistically different from 8 m-control.

^d Statistically different from 8 m-ET1.

^e Statistically different from 8 m-CR.

^f Statistically different from 8 m-CR-ET1.

In addition, eNOS gene expression in renal arteries of 8 m-CR rats was significantly lower than that of 8 m rats (Fig. 3E; *P* < 0.05). The gene expression of iNOS (Fig. 3F), nNOS (Fig. 3G), and COX-2 (Fig. 3H) were unchanged among experimental groups.

3.1.6. Effect of age and caloric restriction on the gene expression of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and transforming growth factor beta (TGF-β) in renal arteries

The gene expression of IL-6, IL-1β, TNF-α and TGF-β in renal arteries of 3 m, 8 m and 8 m-CR rats is shown in Table 3. IL-6 and TGF-β mRNA levels were not modified neither by age nor by CR. On the contrary, TNF-α and IL-1β gene expression was decreased in renal arteries from 8 m rats compared to young rats (*P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively). CR did not modify the gene expression of none of these genes except IL-1β that was significantly decreased in renal arteries from 8 m-CR compared to 8 m rats (*P* < 0.05).

3.2. Results in 24-month-old rats

3.2.1. Effect of age and caloric restriction in the contractile response of renal arteries to endothelin-1

Fig. 4 shows the dose-response curve to ET-1 (A) and the log of ED50 (B) in renal artery segments from 3 m, 24, and 24 m-CR rats. The contractile response to ET-1 was increased both in 24 m and 24 m-CR rats compared to young animals from the dose of 10^{-9.5} M on, and this was

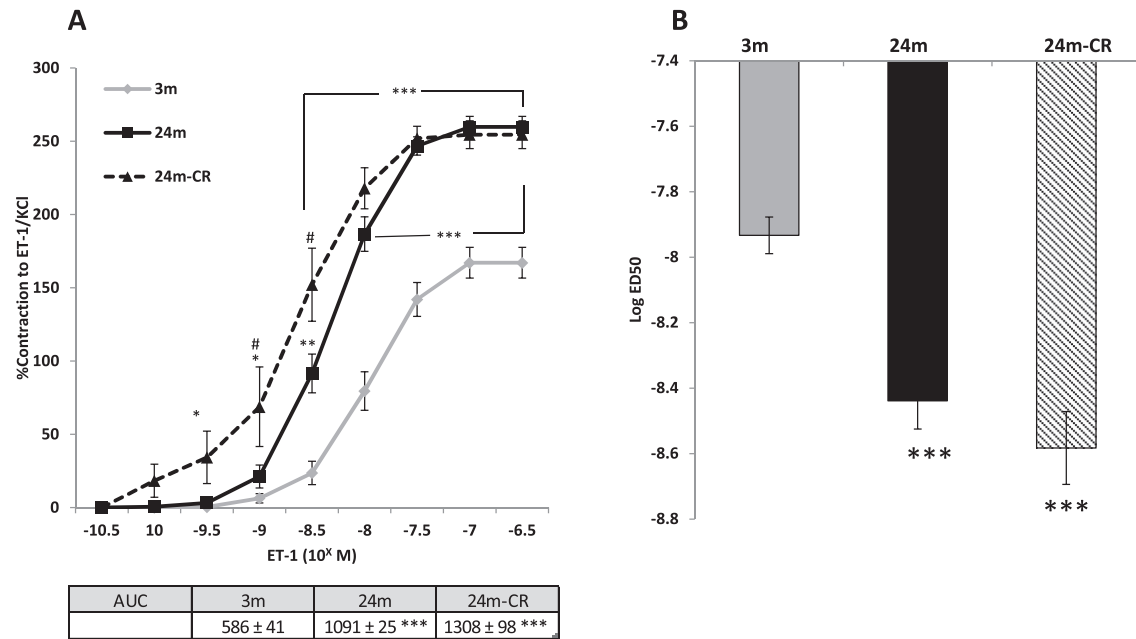


Fig. 4. Contractile response (4A) and log of ED50 (4B) of renal artery segments from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m) and 24-month-old Wistar rats fed ad libitum (24 m), or subjected to caloric restriction (24 m-CR) in response to endothelin-1. Data are represented as mean ± SEM ($n = 8$ rats/group). * $P < 0.05$ vs 3 m; ** $P < 0.01$ vs 3 m; *** $P < 0.001$ vs 3 m; # $P < 0.05$ vs 24 m.

associated with a significant decrease in the log of ED50 ($P < 0.001$ for both) and with a significant increase in the AUC ($P < 0.001$ for both). In addition, renal artery segments from 24 m-CR showed an increased response to ET-1 compared to 24 m rats at the doses of 10^{-9} ($P < 0.05$) and $10^{-8.5}$ M ($P < 0.05$), although no significant changes were found neither in the log of ED50 nor in the AUC between this two experimental groups.

3.2.2. Implication of endothelin receptors ET-A and ET-B in the contractile response of renal artery segments to ET-1

Blockade of ET-A receptors shifted to the right the dose-response curves to ET-1, and this was associated with a significant increase in the log of ED50 in all experimental groups ($P < 0.01$ for 3 m; $P < 0.001$ for 24 m; $P < 0.001$ for 24 m-CR) and with a significant decrease in the AUC in 24 m and 24 m-CR rats ($P < 0.001$ for both). Moreover, pre-incubation of renal artery segments with the ET-A blocker BQ-123 significantly increased the contractile response to ET-1 in young rats at the dose of $10^{-6.5}$ M (Fig. 5A; $P < 0.05$ vs control) but not in renal artery segments from 24 m and 24 m-CR rats.

Pre-incubation of renal artery segments with the ET-B blocker BQ-788 did not modify the contractile response to ET-1 in young rats, but it also shifted to the right the dose-response curves both in 24 m and 24 m-CR, together with a significant increase in the log of ED50 ($P < 0.05$ for both) and a significant decrease in the AUC ($P < 0.05$ for both) compared to 3 m rats.

3.2.3. Effect of age and caloric restriction in the gene expression of endothelin-1 and in the content of endothelin-1 receptors in renal arteries

ET-1 gene expression in renal arteries was unchanged in 24 m (146 ± 30) and 24 m-CR (115 ± 10) compared to 3 m (100 ± 9.8) rats. The protein levels of receptor ET-A were not modified in renal arteries from 24 m rats compared to 3 m rats although they were significantly up-regulated in renal arteries from 24 m-CR compared to 24 m rats (Fig. 5E; $P < 0.01$). ET-B protein levels were significantly down-regulated both in renal arteries from 24 m and from 24 m-CR compared to 3 m rats (Fig. 5F; $P < 0.05$ for both).

3.2.4. Implication of nitric oxide in the contractile response of renal artery segments to ET-1

Blockade of nitric oxide production by pre-incubation of renal artery segments with L-NAME prior to the ET-1 dose-response curve significantly increased the contractile response to ET-1 in 3 m rats at the doses of $10^{-8.5}$ ($P < 0.01$), 10^{-8} ($P < 0.05$), $10^{-7.5}$ ($P < 0.05$), 10^{-7} ($P < 0.05$), and $10^{-6.5}$ M ($P < 0.05$) (Fig. 6A) and in 24 m rats at the doses of $10^{-7.5}$ ($P < 0.05$), 10^{-7} ($P < 0.05$), and $10^{-6.5}$ M ($P < 0.05$) (Fig. 6B). However, it only shifted to the left the dose-response curve and significantly decreased the log of ED50 in young animals ($P < 0.05$), although a significant increase in the AUC in response to L-NAME was found in both experimental groups ($P < 0.05$ for both). On the contrary, L-NAME did not modify the response to ET-1 in renal artery segments from 24 m-CR rats (Fig. 6C).

The concentration of nitrites was measured in the culture medium after incubation of renal artery segments from 3 m rats, 24 m rats, and 24 m-CR rats either with vehicle (control) or Endothelin-1 (ET-1) 10^{-7} M for 30 min (Table 2). The concentration of nitrites, both in basal conditions and after ET-1 incubation, was significantly increased in 24 m and 24 m-CR rats compared to 3 m rats ($P < 0.001$). Incubation with ET-1 did not modify the concentration of nitrites in none of the experimental groups.

3.2.5. Effect of age and caloric restriction in the gene expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), inducible nitric oxide synthase (nNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) in renal arteries

eNOS (Fig. 6E) and nNOS (Fig. 6G) gene expression was significantly down-regulated in 24 m rats compared to 3 m rats ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively) whereas iNOS (Fig. 6F) and COX-2 (Fig. 6H) mRNA levels were up-regulated ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). Caloric restriction attenuated aging-induced decrease of eNOS gene expression ($P < 0.05$), and aging-induced up-regulation of iNOS mRNA levels in renal arteries ($P < 0.05$), although iNOS mRNA levels remained increased compared to 3 m rats ($P < 0.05$).

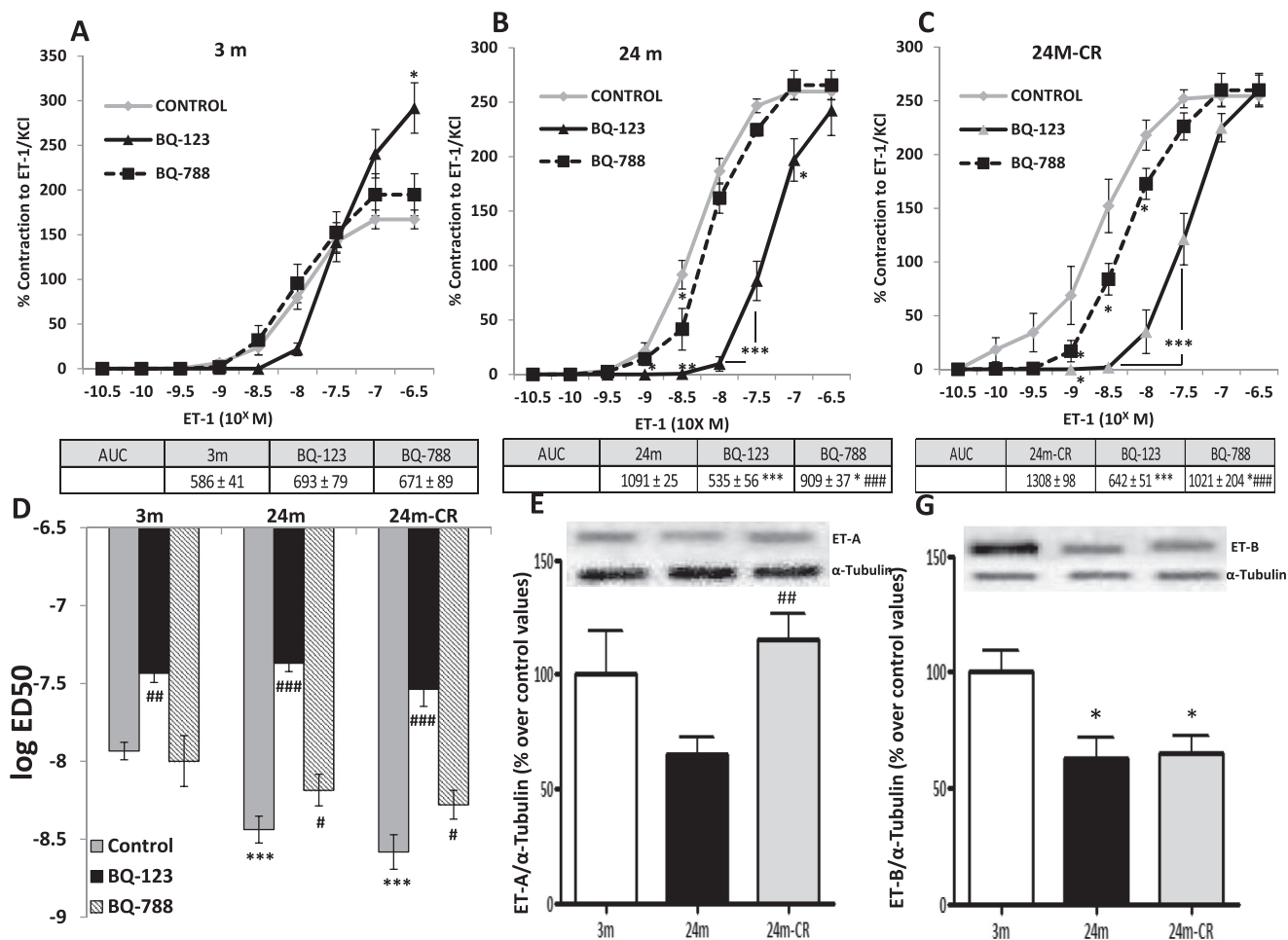


Fig. 5. Contractile response of renal artery segments from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m; 5A) and 24-month-old Wistar rats fed ad libitum (24 m; 5B), or subjected to caloric restriction (24 m-CR; 5C) and log of ED50 (5D) in response to endothelin-1 after pre-incubation with vehicle, BQ-123, or BQ-788. Fig. 5E and F represent the protein levels of endothelin-1 receptor A and endothelin-1 receptor B, respectively, in renal arteries from 3 m, 24 m, and 24 m-CR rats. Data are represented as mean ± SEM ($n = 8$ rats/group). * $P < 0.05$ vs 3 m; ** $P < 0.01$ vs 3 m; *** $P < 0.001$ vs 3 m; # $P < 0.05$ vs 24 m; ## $P < 0.01$ vs 24 m; ### $P < 0.001$ vs 24 m.

3.2.6. Effect of age and caloric restriction on the gene expression of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and transforming growth factor beta (TGF- β) in renal arteries

Neither aging nor caloric restriction altered the gene expression of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and COX-2 in renal arteries from 24 and 24 m-CR rats compared to 3 m rats (Table 3).

4. Discussion

Moderate caloric restriction has been reported as an effective intervention for the treatment and prevention of aging-induced alterations in renal function attenuating glomerulosclerosis and alterations in glomerular filtration (Wiggins et al., 2005). In the present study, we have analyzed the possible beneficial effects of a moderate protocol of caloric restriction on aging-induced alterations in renal circulation, and specifically in the response of renal arteries to the vasoconstrictor peptide endothelin-1. This study is relevant since a higher contraction in response to this peptide has been reported in renal arteries from obese mice due, at least in part, to an up-regulation in the endothelial gene expression of ET-1 (Baretella et al., 2014), with this fact possibly being involved in the development of hypertension. Aging has a common factor with obesity in terms of adiposity, as both subcutaneous and visceral adiposity are clearly increased with age (Granado et al., 2014; Horrillo et al., 2011). Therefore, we hypothesized that aging-induced adiposity may also affect the renal response to ET-1 and, if so, maybe it could be

prevented by decreasing adiposity through a moderate caloric restriction protocol. Although other authors have reported effects of caloric restriction in the arterial gene expression of ET-1 in aged rats (Facchetti et al., 2007), to our knowledge, this is the first study showing the effects of both aging and caloric restriction on the renal vascular response to ET-1.

The response of renal artery segments to ET-1, and the expression of ET-1 and its receptors in arterial tissue in 8- and 24-month-old rats, either fed ad libitum or subjected to a moderate caloric restriction regimen, was analyzed and compared with young rats (3 months old). We have compared rats of these two ages because, although this protocol of caloric restriction has been proven to be effective in terms of decrease of body weight and adiposity at both ages (De Solis et al., 2012; Fernandez et al., 2009; Horrillo et al., 2011), previous data show that it is only able to prevent metabolic alterations such as decrease of HOMA index and circulating levels of fatty acids and cytokines (Horrillo et al., 2011), insulin resistance in skeletal muscle (De Solis et al., 2012), or increased resistin receptor gene expression in adipose tissue (Fernandez et al., 2009) in 8 m rats but not in 24 m rats.

However, unpublished data from our group did not show any significant improvement of caloric restriction in myocardial function in 8 m rats, neither in basal conditions nor in response to ET-1. In contrast, we did find a significant effect of CR improving myocardial function, decreasing the gene expression of inflammatory markers and increasing the gene expression of eNOS in 24 m rats (Granado et al., 2014). Thus, it is possible that this specific regimen of caloric restriction has different effects in metabolism and in cardiovascular function.

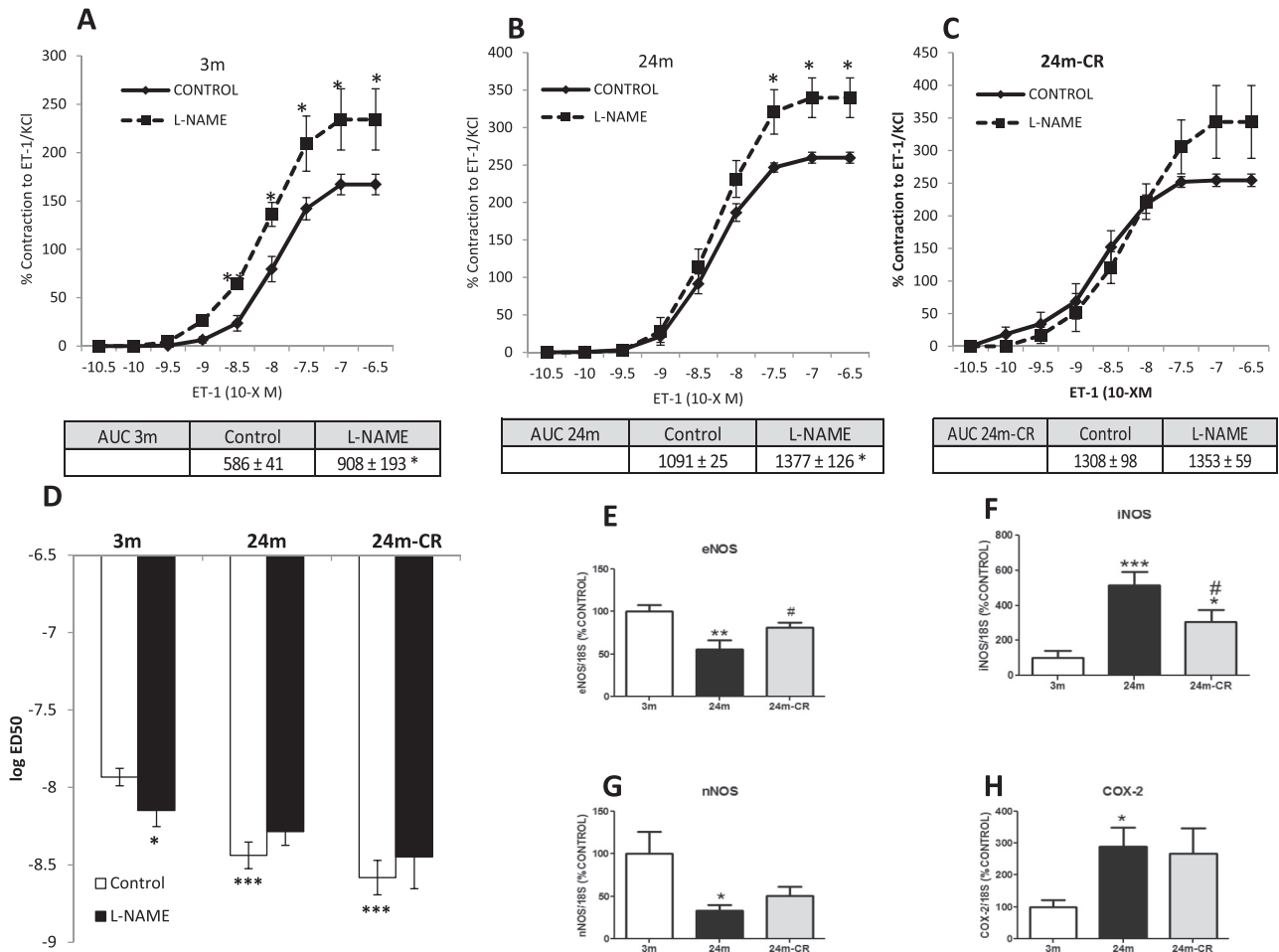


Fig. 6. Contractile response of renal artery segments from 3-month-old Wistar rats fed ad libitum (3 m; 6A) and 24-month-old Wistar rats fed ad libitum (24 m; 6B), or subjected to caloric restriction (24 m-CR; 6C) and log of ED50 (6D) in response to endothelin-1 after pre-incubation with vehicle or N^o-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). Fig. 6E, F, G, and H represents the gene expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2), respectively, in renal arteries from 3 m, 24 m, and 24 m-CR rats. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 8 rats/group). **P* < 0.05 vs 3 m; ***P* < 0.01 vs 3 m; ****P* < 0.001 vs 3 m; #*P* < 0.05 vs 24 m; ##*P* < 0.01 vs 24 m; ###*P* < 0.001 vs 24 m.

As previously described, ET-1 induced a dose-response contractile response in renal artery segments in all experimental groups (Clozel and Clozel, 1989; Meyer et al., 2014; Pernow et al., 1988; Widmer et al., 2006).

The results in 8 m rats show that renal arteries from 8 m rats fed ad libitum have increased contraction to ET-1 compared to renal arteries from 3 m rats, whereas the contraction to ET-1 in renal arteries from 8 m-CR was not different to that of young animals. The contraction of renal arteries segments to ET-1 seems to be mediated by ET-A receptors in all experimental groups, since blockade of these receptors with BQ-

123 increases the log of ED50, so a higher dose of ET-1 is required to produce the 50% of the maximum effect. This is in accordance with most of the reported results in which the vascular contraction to ET-1 is mainly mediated by ET-A receptors (Thorin and Clozel, 2010; Vignon-Zellweger et al., 2012). However, since the BQ-123-induced increase in the log of ED50 was similar in all experimental groups, the increased response of renal arteries to ET-1 in 8 m rats fed ad libitum does not appear to be mediated exclusively by ET-A receptors. Protein levels of ET-A were significantly up-regulated in renal arteries from 8 m rats, which is in accordance with the increased vascular response to ET-1 at

Table 2

Concentration of nitrites (μM) in the culture medium after incubation of renal artery segments from 3-month-old rats (3 m), 24-month-old rats (24 m), and 24-month-old rats subjected to caloric restriction (24 m-CR) either with vehicle (control) or endothelin-1 (ET-1) 10⁻⁷ M for 30 min.

	Control	ET-1 (10 ⁻⁷ M)
3 m	1.5 ± 0.3 ^{c,d,e,f}	2.4 ± 0.3 ^{c,d,e,f}
24 m	6.9 ± 1.5 ^{a,b}	7.8 ± 0.7 ^{a,b}
24 m-CR	7.3 ± 1 ^{a,b}	8.5 ± 0.8 ^{a,b}

^a Statistically different from 3 m-control.

^b Statistically different from 3 m-ET1.

^c Statistically different from 24 m-control.

^d Statistically different from 24 m-ET1.

^e Statistically different from 24 m-CR.

^f Statistically different from 24 m-CR-ET1.

Table 3

mRNA levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and transforming growth factor beta (TGF-β) in renal arteries from 3-month-old rats (3 m), 8-month-old rats, and 24-month-old rats either fed ad libitum (8 m) and (24 m) or subjected to caloric restriction (8 m-CR) and (24 m-CR). Data are represented as mean ± SEM (*n* = 8 rats/group).

	IL-6	IL-1β	TNF-α	TGF-β
3 m	100 ± 13.8	100 ± 15.4	100 ± 10.9	100 ± 13.2
8 m	119.9 ± 8	75.5 ± 7.8**	59.7 ± 12.4*	90.7 ± 8.8
8 m-CR	129.2 ± 20.3	40.4 ± 5.7**,#	65.7 ± 13.1	89.9 ± 10.7
24 m	106 ± 20.9	85.2 ± 17.9	106 ± 20.8	114 ± 20.5
24 m-CR	125 ± 17.2	123 ± 19	127 ± 30.8	127.6 ± 19.8

* *P* < 0.05 vs 3 m.

** *P* < 0.01 vs 3 m.

P < 0.05 vs 8 m.

this age. Likewise, the protein levels of ET-A were also increased in renal arteries from 8 m-CR rats, although there was also a significant up-regulation in the protein content of ET-B. Since endothelial ET-B receptors mediate the release of relaxing factors such as nitric oxide, prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing factor (Mazzuca and Khalil, 2012), the lower contractile response to ET-1 in this experimental group is most likely due to ET-B up-regulation. Indeed, in renal arteries from 8 m-CR rats, the response to ET-1 was increased after blockade with the ET-B antagonist BQ-788, with this fact possibly meaning that in this experimental group, ET-B receptors counteract the contractile response to ET-1 induced by ET-A activation. Moreover, the concentration of nitrites was significantly increased in the culture medium after incubation of renal artery segments from 8 m-CR rats with ET-1, which indicates an increased production of nitric oxide only in this experimental group. Thus, it is possible that renal arteries from 8 m-CR rats produce more NO because they express more vasodilator ET-B receptors in the endothelium than 8 m rats to partially counteract the contractile effect to ET-1 mediated by ET-A. However, since the levels of these receptors were not specifically measured in the endothelium but in the whole vessel, it is not possible to certainly assess whether the endothelial expression of ET-B receptors is modified in response to caloric restriction or not, which may be considered as a limitation of the study.

Blockade of NO with the NOS inhibitor L-NAME significantly increased the contractile response to ET-1 and the log of ED50 both in 3 m and in 8 m-CR rats but not in 8 m rats. Therefore, it is clear that NO counteracts the contractile response to ET-1 in these two experimental groups. As blockade of ET-B receptors potentiated the contractile response to ET-1 in renal arteries from 8 m-CR rats but not in renal arteries from 3 m rats, it is possible that in 8 m-CR rats, the counteracting NO proceeds from the activation of ET-B receptors whereas in 3 m rats this NO is provided by other mechanisms. However, whether the gene expression of ET-B receptors is modified in response to ET-1 specifically in the endothelium in these experimental groups remains to be determined.

Regarding the effects of ET-1 in renal arteries from 24-month-old rats fed ad libitum (24 m) and 24-month-old rats subjected to CR (24 m-CR), our results show that there are no significant differences between the two experimental groups, although this contraction was clearly augmented compared to young rats. Similarly, an increased contractile response to ET-1 has also been reported in aged rats both in renal arteries (Meyer et al., 2014; Seo and Luscher, 1995) and in other vascular beds such as aorta (Meyer et al., 2014; Rubio et al., 2006; Zanetti et al., 2010), skeletal muscle arterioles (Donato et al., 2005), or coronary arteries (Goodwin et al., 1999; Ishihata and Katano, 2006; Korzick et al., 2005). However, in coronary arteries, a decreased response to ET-1 in aged rats has also been reported (Granado et al., 2014). The increased contraction to ET-1 in renal artery segments from 24 m rats does not seem to be mediated by an increased ET-1 synthesis in arterial tissue since ET-1 mRNA levels were unchanged among groups. However, other authors have reported increased ET-1 levels in aged rats (Goettsch et al., 2001). These contradictory data may be due either to measurement of protein vs mRNA levels or either to the use of different rat strains (Wistar vs WKY).

Similarly to results in 8 m rats, the contractile response to ET-1 was associated with an increase in the log of ED50 after blockade with BQ-123, which means that ET-A is involved in the ET-1 contraction of renal artery segments in all experimental groups. Interestingly, ET-B blockade also resulted in a significant increase in the log of ED50 and in a significant decrease in the AUC in 24 m and 24 m-CR rats but not in 3 m rats. Therefore, it appears that in aged rats, ET-B receptors also participate in the contractile response of renal artery segments to ET-1, as it has been previously described in coronary arterioles (LeBlanc et al., 2013). Indeed, the vascular response to ET-1 in aged individuals is not only mediated by ET-A but also by ET-B receptors, which are reported to induce endothelium-derived contraction in certain conditions, including aging (Shah, 2007; Vanhoutte and Tang, 2008).

However, other authors have reported that ET-B receptors are not involved in the increased vascular response to ET-1, neither in coronary arteries (Korzick et al., 2005) from aged rats nor in the forearm from old humans (Van Guilder et al., 2007). These opposite results could be explained because of the different vascular beds and also because of the different species (rats vs humans) or rat strains (Wistar vs. Fisher 344).

Unexpectedly, our results show that the increased response to ET-1 in renal artery segments from 24 m and 24 m-CR rats is not associated neither with an increase in the protein levels of ET-A nor with an increase in the protein levels of ET-B. In fact, the protein levels of ET-B were significantly decreased in renal arteries from both 24 m and 24 m-CR rats which may be related to a negative feedback due to the reported age-induced increase in circulating ET-1 levels (Nyberg et al., 2013). Although the protein content of ET-1 receptors in renal arteries were either unchanged or decreased in aged rats in basal conditions, we cannot exclude that the levels of these receptors may be changed in response to ET-1. In addition, since the protein analysis of both ET-A and ET-B has been performed in the whole vessel, it is not possible to certainly assess the exact amount of these receptors in the muscle and in the endothelium, which may be considered as a limitation of the study.

As expected, the blockade with L-NAME increased the contractile response of renal arteries to ET-1 in 3 m rats, and this was associated with a significant decrease in the log of ED50, with this effect clearly pointing to a counteracting effect of NO to the contractile response to ET-1 in young rats. On the contrary, in 24 m rats, pre-incubation with L-NAME did not decrease the log of ED50, although it significantly increased the contractile response to ET-1 at high concentrations. However, this effect was not found in renal artery segments from 24 m-CR rats in which NOS blockade did not induce any effect.

Finally, our results show that CR prevents the aging-induced up-regulation of iNOS mRNA levels and attenuates the aging-induced down-regulation of eNOS and ET-B gene expression in arterial tissue. However, the gene expression of different pro-inflammatory and profibrotic markers are not modified. Likewise, CR-induced improvement of endothelial dysfunction in aorta segments from aged rats is also reported to be mediated by a decrease in the gene expression of iNOS (Zanetti et al., 2010). However, in the study performed by Zanetti et al., they also found an improvement in vascular function in rats subjected to CR, whereas in our study we did not find differences between 24 m and 24 m-CR. This opposite results may be explained by the differences in the caloric restriction protocol, by differences in the vascular beds (renal artery vs aorta), and also by differences in the age of young rats (6 m vs 3 m). In addition, in their study, endothelium-dependent vasorelaxation is studied whereas in ours the objective was to analyze the contractile response to ET-1. Therefore, the results are not completely comparable. Likewise, morphological or biochemical changes are not always translated into functional changes, as it occurs with ERA treatment in aged rats in which reduction of renal glomerulosclerosis and improvement of podocytes ultrastructure does not result neither in an improvement in renal function nor in changes in blood pressure (Barton, 2014; Ortmann et al., 2004).

In conclusion, the contractile response to ET-1 is increased in renal arteries from both 8 m and 24 m rats compared to young animals with this effect being mediated by ET-A receptors and also by ET-B receptors in the case of 24 m rats. Caloric restriction prevents the aging-induced increased contractile response to ET-1 in 8 m rats, possibly by an up-regulation/activation of relaxing ET-B receptors in the endothelium. However, in 24 m rats, CR does not attenuate the aging increased response of renal arteries to ET-1, although it prevents the aging-induced increase in iNOS mRNA levels and the aging-induced decrease in eNOS mRNA levels in arterial tissue.

Thus, based on our results, it is clear that, although it is not translated in an improvement of vascular function, this specific protocol of caloric restriction may have an impact preventing, or at least attenuating,

aging-induced endothelial dysfunction. Whether changes in caloric restriction intensity and/or duration would have induced most evident changes remains to be determined.

Funding

This work has been funded by Proyectos UAM-Banco Santander de Cooperación Internacional con EEUU (Convocatoria, 2013).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2016.12.020>.

References

- Baretella, O., Chung, S.K., Barton, M., Xu, A., Vanhoutte, P.M., 2014. Obesity and heterozygous endothelial overexpression of prepro-endothelin-1 modulate responsiveness of mouse main and segmental renal arteries to vasoconstrictor agents. *Life Sci.* 118, 206–212.
- Barton, M., 2014. Aging and endothelin: determinants of disease. *Life Sci.* 118, 97–109.
- Barton, M., Cosentino, F., Brandes, R.P., Moreau, P., Shaw, S., Luscher, T.F., 1997. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 30, 817–824.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15 (532–534), 536–537.
- Clozel, M., Clozel, J.-P., 1989. Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 1125–1131.
- De Solis, A.J., Fernandez-Agullo, T., Garcia-SanFrutos, M., Perez-Pardo, P., Bogonez, E., Andres, A., Ros, M., Carrascosa, J.M., 2012. Impairment of skeletal muscle insulin action with aging in Wistar rats: role of leptin and caloric restriction. *Mech. Ageing Dev.* 133, 306–316.
- Donato, A.J., Lesniewski, L.A., Delp, M.D., 2005. The effects of aging and exercise training on endothelin-1 vasoconstrictor responses in rat skeletal muscle arterioles. *Cardiovasc. Res.* 66, 393–401.
- Facchetti, F., Monzani, E., Cavallini, G., Bergamini, E., La Porta, C.A., 2007. Effect of a caloric restriction regimen on the angiogenic capacity of aorta and on the expression of endothelin-1 during ageing. *Exp. Gerontol.* 42, 662–667.
- Fernandez, C.M., Molto, E., Gallardo, N., del Arco, A., Martinez, C., Andres, A., Ros, M., Carrascosa, J.M., Arribas, C., 2009. The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. *Metabolism* 58, 204–211.
- Goettsch, W., Lattmann, T., Amann, K., Szibor, M., Morawietz, H., Munter, K., Muller, S.P., Shaw, S., Barton, M., 2001. Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 908–913.
- Goodwin, A.T., Amrani, M., Marchbank, A.J., Gray, C.C., Jayakumar, J., Yacoub, M.H., 1999. Coronary vasoconstriction to endothelin-1 increases with age before and after ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 41, 554–562.
- Granado, M., Rubio, C., Amor, S., Monge, L., Fernandez, N., Carreno-Tarragona, G., Carrascosa, J.M., Garcia-Villalon, A.L., 2014. Effects of age and caloric restriction on the cardiac and coronary response to endothelin-1 in rats. *Exp. Gerontol.* 60, 183–189.
- Harman, D., 2001. Aging: overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 1–21.
- Harvey, A., Montezano, A.C., Touyz, R.M., 2015. Vascular biology of ageing—implications in hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 83, 112–121.
- Horillo, D., Sierra, J., Arribas, C., Garcia-San Frutos, M., Carrascosa, J.M., Lauzurica, N., Fernandez-Agullo, T., Ros, M., 2011. Age-associated development of inflammation in Wistar rats: effects of caloric restriction. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 140–150.
- Ishihata, A., Katano, Y., 2006. Role of angiotensin II and endothelin-1 receptors in aging-related functional changes in rat cardiovascular system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 173–181.
- Kohan, D.E., Barton, M., 2014. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 86, 896–904.
- Kohan, D.E., Rossi, N.F., Inscho, E.W., Pollock, D.M., 2011. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol. Rev.* 91, 1–77.
- Korzick, D.H., Muller-Delp, J.M., Dougherty, P., Heaps, C.L., Bowles, D.K., Krick, K.K., 2005. Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C. *Cardiovasc. Res.* 66, 384–392.
- Lakatta, E.G., 2015. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 83, 1–13.
- Lakatta, E.G., Levy, D., 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation* 107, 139–146.
- LeBlanc, A.J., Chen, B., Dougherty, P.J., Reyes, R.A., Shipley, R.D., Korzick, D.H., Muller-Delp, J.M., 2013. Divergent effects of aging and sex on vasoconstriction to endothelin in coronary arterioles. *Microcirculation* 20, 365–376.
- Lindeman, R.D., 1990. Overview: renal physiology and pathophysiology of aging. *Am. J. Kidney Dis.* 16, 275–282.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[−]($\Delta\Delta C_T$) method. *Methods* 25, 402–408.
- MacIntyre, J.N., Slusar, J.E., Zhu, J., Dong, A.X., Howlett, S.E., Kelly, M.E., 2012. Age-associated alterations in retinal arteriole reactivity to endothelin-1 differ between the sexes. *Mech. Ageing Dev.* 133, 611–619.
- Mazzuca, M.Q., Khalil, R.A., 2012. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 84, 147–162.
- Meyer, M.R., Barton, M., Prossnitz, E.R., 2014. Functional heterogeneity of NADPH oxidase-mediated contractions to endothelin with vascular aging. *Life Sci.* 118, 226–231.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.
- Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Iida, K., Ajisaka, R., Suzuki, N., Fujino, M., Goto, K., Masaki, T., Sugishita, Y., 1992. Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects. *Am. Heart J.* 123, 1092–1093.
- Nyberg, M., Mortensen, S.P., Hellsten, Y., 2013. Physical activity opposes the age-related increase in skeletal muscle and plasma endothelin-1 levels and normalizes plasma endothelin-1 levels in individuals with essential hypertension. *Acta Physiol. (Oxf.)* 207, 524–535.
- Ortmann, J., Amann, K., Brandes, R.P., Kretzler, M., Munter, K., Parekh, N., Traupe, T., Lange, M., Lattmann, T., Barton, M., 2004. Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition. *Hypertension* 44, 974–981.
- Pernow, J., Franco-Cereceda, A., Matran, R., Lundberg, J.M., 1988. Effect of endothelin-1 on regional vascular resistances in the pig. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13, S205–S206.
- Rubio, M.E., Banos, G., Diaz, E., Guarner, V., 2006. Effect of age on insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Exp. Gerontol.* 41, 282–288.
- Seo, B., Luscher, T.F., 1995. ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in renal artery of aging SHR. Effects of FR139317 and bosentan. *Hypertension* 25, 501–506.
- Shah, R., 2007. Endothelins in health and disease. *Eur. J. Intern. Med.* 18, 272–282.
- Shinmura, K., 2011. Cardiovascular protection afforded by caloric restriction: essential role of nitric oxide synthase. *Geriatr. Gerontol. Int.* 11, 143–156.
- Thorin, E., Clozel, M., 2010. The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1. *Adv. Pharmacol.* 60, 1.
- Toda, N., 2012. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol. Ther.* 133, 159–176.
- Van Guilder, G.P., Westby, C.M., Greiner, J.J., Stauffer, B.L., DeSouza, C.A., 2007. Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. *Hypertension* 50, 403–409.
- Vanhoutte, P.M., Tang, E.H., 2008. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J. Physiol.* 586, 5295–5304.
- Vignon-Zellweger, N., Heiden, S., Miyauchi, T., Emoto, N., 2012. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sci.* 91, 490–500.
- Westby, C.M., Weil, B.R., Greiner, J.J., Stauffer, B.L., DeSouza, C.A., 2011. Endothelin-1 vasoconstriction and the age-related decline in endothelium-dependent vasodilatation in men. *Clin. Sci.* 120, 485–491.
- Widmer, C.C., Mundy, A.L., Kretz, M., Barton, M., 2006. Marked heterogeneity of endothelin-mediated contractility and contraction dynamics in mouse renal and femoral arteries. *Exp. Biol. Med.* 231, 777–781.
- Wiggins, J.E., Goyal, M., Sanden, S.K., Wharram, B.L., Shedden, K.A., Misk, D.E., Quirk, R.D., Wiggins, R.C., 2005. Podocyte hypertrophy, “adaptation,” and “decompensation” associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by caloric restriction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2953–2966.
- Yan, L., Gao, S., Ho, D., Park, M., Ge, H., Wang, C., Tian, Y., Lai, L., De Lorenzo, M.S., Vatner, D.E., et al., 2013. Caloric restriction can reverse, as well as prevent, aging cardiomyopathy. *Age* 35, 2177–2182.
- Yang, H., Fogo, A.B., 2010. Cell senescence in the aging kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1436–1439.
- Zanetti, M., Cappellari, G.G., Burekovic, I., Barazzoni, R., Stebel, M., Guarneri, G., 2010. Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular aging: effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta. *Exp. Gerontol.* 45, 848–855.
- Zieman, S.J., Melenovsky, V., Kass, D.A., 2005. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 932–943.